

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna
DIPARTIMENTO DI SCIENZE BIOMEDICHE E NEUROMOTORIE
DOTTORATO DI RICERCA IN
Scienze Biomediche
Ciclo XXVI

Settore Concorsuale di afferenza: 05/D1

Settore Scientifico disciplinare: BIO/09

TITOLO TESI

**EFFETTI SULLE FUNZIONI AUTONOMICHE E SUGLI STATI DI VEGLIA
E DI SONNO DELLA MANIPOLAZIONE CENTRALE FARMACOLOGICA
DEL SISTEMA IPOCRETINERGICO NEL RATTO**

Dott.ssa Flavia Del Vecchio

Presentata da: _____

Coordinatore Dottorato

Prof. Lucio Cocco

Relatore

Prof. Roberto Amici

Esame finale anno 2012/2013

INDICE DELLE ABBREVIAZIONI	6
RIASSUNTO	10
INTRODUZIONE.....	14
1. CICLO VEGLIA-SONNO.....	16
1.1 NEUROFISIOLOGIA DEL SONNO	16
1.2 SONNO NREM E SONNO REM.....	20
1.3 OMEOSTASI DEL SONNO	22
1.4 SONNO E MASSA CORPOREA.....	25
1.5 SONNO E TEMPERATURA.....	26
1.6 CONTROLLO NERVOSO CENTRALE DEL SONNO.....	28
2. TERMOREGOLAZIONE.....	31
2.1 SCAMBIO DI CALORE TRA ORGANISMO E AMBIENTE	31
2.2 TERMOREGOLAZIONE COMPORTAMENTALE.....	32
2.3 TERMOREGOLAZIONE NON COMPORTAMENTALE.....	33
2.4 RISPOSTE EVOCATE DALL'ESPOSIZIONE AD AMBIENTI FREDDI.....	34
2.4.1 Meccanismi di aumentata produzione del calore	34
2.4.2 Meccanismi di aumentata conservazione del calore	37
2.5 RISPOSTE TERMOREGOLATORIE EVOCATE DALL'ESPOSIZIONE AD AMBIENTI CALDI	39
2.6 CONTROLLO NERVOSO CENTRALE DELLA TERMOREGOLAZIONE	40
2.6.1 Generalità sul Sistema Nervoso Autonomo	40
2.6.2 Afferenze autonome simpatiche dirette ai vasi e agli organi termoregolatori...	42
2.6.3 Premotoneuroni simpatici	43
2.6.4 Bulbo rostrale ventromediale	44
3. REGOLAZIONE DELLA TEMPERATURA CORPOREA E DELLA FUNZIONE CARDIOVASCOLARE DURANTE IL SONNO	46
4. IPOTALAMO LATERALE.....	53
4.1 ANATOMIA FUNZIONALE DELL'IPOTALAMO LATERALE	53
4.2 PRINCIPALI POPOLAZIONI NEURONALI DELL'IPOTALAMO LATERALE	58

4.2.1 Neuroni ipocretinergici	60
4.2.2 Neuroni MCH-ergici	62
4.2.3 Relazioni tra neuroni ipocretinergici e neuroni MCH-ergici	64
4.3 MODULAZIONE DELL'ATTIVITÀ DEI NEURONI IPOCRETINERGICI	65
4.3.1 Ipotalamo laterale e controllo della leptina sui neuroni ipocretinergici	66
4.3.2 Neuroni ipocretinergici e glucosio	70
4.3.3 Ipocretina e controllo dell'attivazione fisiologica e comportamentale	72
4.4 IPOTALAMO LATERALE E SONNO.....	77
4.5 IPOTALAMO LATERALE E CONTROLLO CARDIOVASCOLARE.....	78
4.6 IPOTALAMO LATERALE E CONTROLLO TERMOREGOLATORIO	80
5. SCOPO DELLA TESI	80
MATERIALI E METODI.....	82
1. INTERVENTO CHIRURGICO.....	84
1.1 PREPARAZIONE ELETTRODI.....	84
1.2 TERMISTORI.....	85
1.3 RILEVAZIONE DELLA PRESSIONE ARTERIOSA.....	86
1.4 CHIRURGIA.....	86
2. APPARATO DI REGISTRAZIONE	89
2.1 BOX DI REGISTRAZIONE.....	89
2.2 POSTAZIONI DI REGISTRAZIONE.....	89
3. AMPLIFICAZIONE E ACQUISIZIONE DEL SEGNALE.....	90
4. MCROINIEZIONI NEL RATTO LIBERO DI MUOVERSI.....	90
5. PIANO SPERIMENTALE.....	91
5.1 ESPERIMENTO A	91
5.2 ESPERIMENTO B.....	92
6. ISTOLOGIA	92
7. ANALISI STATISTICA	93
RISULTATI.....	96

1. ESPERIMENTO A	98
1.1 EFFETTI INDOTTI SUL CICLO VEGLIA-SONNO DA INIEZIONI RIPETUTE DI MUSCIMOLO O DI SOLUZIONE SALINA NELL'IPOTALAMO LATERALE	98
1.2 EFFETTI INDOTTI SULLA TEMPERATURA IPOTALAMICA DA INIEZIONI RIPETUTE DI MUSCIMOLO O DI SOLUZIONE SALINA NELL'IPOTALAMO LATERALE	101
1.3 EFFETTI INDOTTI SULLA PRESSIONE ARTERIOSA MEDIA DA INIEZIONI RIPETUTE DI MUSCIMOLO O DI SOLUZIONE SALINA NELL'IPOTALAMO LATERALE	101
1.4 EFFETTI INDOTTI SULLA FREQUENZA CARDIACA DA INIEZIONI RIPETUTE DI MUSCIMOLO O DI SOLUZIONE SALINA NELL'IPOTALAMO LATERALE	102
2. ESPERIMENTO B.....	103
2.1 EFFETTI INDOTTI SUL CICLO VEGLIA-SONNO DALL'INIEZIONE DI IPOCRETINA O DI SOLUZIONE SALINA NELL'RVMM	103
2.2 EFFETTI INDOTTI SULLA TEMPERATURA IPOTALAMICA DALL'INIEZIONE DI IPOCRETINA O DI SOLUZIONE SALINA NELL'RVMM	105
2.3 EFFETTI INDOTTI SULLA PRESSIONE ARTERIOSA MEDIA DALL'INIEZIONE DI IPOCRETINA O DI SOLUZIONE SALINA NELL'RVMM	106
2.4 EFFETTI INDOTTI SULLA FREQUENZA CARDIACA DALL'INIEZIONE DI IPOCRETINA O DI SOLUZIONE SALINA NELL'RVMM	107
DISCUSSIONE.....	110
CONCLUSIONI.....	124
FIGURE	128
BIBLIOGRAFIA.....	174

INDICE DELLE ABBREVIAZIONI

5-HT1A: recettore serotoninergico 1-A

AgRP: peptide correlato alla proteina agouti

AVA: anastomosi artero-venosa

BAT: tessuto adiposo bruno

CART: trascritto regolato dalla cocaina e dall'anfetamina

DA: dopamina

DMH: ipotalamo dorsomediale

DREADD: recettori costruiti attivati esclusivamente da farmaci costruiti

DRN: nucleo del raphe dorsale

EEG: elettroencefalogramma

FC: frequenza cardiaca

GABA: acido γ -amminobutirrico

GFP: proteina verde fluorescente

GPCRs: recettori accoppiati a proteine G

ICV: intracerebroventricolare

IML: colonna intermedio-laterale

LC: locus coeruleus

LDT: nucleo laterodorsale tegmentale

LH: ipotalamo laterale

MCH: ormone che concentra la melanina

MCHR: recettore dell'ormone che concentra la melanina

MePO: nucleo preottico mediano

NPY: neuropeptide Y

NREM : non-rapid eye movement

NTS: nucleo del tratto solitario

nuEMG: elettromiogramma nucale

PA: pressione arteriosa

PAM: pressione arteriosa media

PGE2: prostaglandina E2

PMn. nuclei premammillari

POA: area preottica ipotalamica

POMC: pre-opiomelanocortina

PPT: nucleo peduncolopontino tegmentale

PTE: potenza totale dell'elettroencefalogramma

PVN: nucleo paraventricolare ipotalamico

REM: rapid eye movement

RVLM: bulbo rostrale ventrolaterale

RVMM: bulbo rostrale ventromediale

SLD: nucleo sublaterodorsale

SNA: sistema nervoso autonomo

SNC: sistema nervoso ncentrale

SNS: sistema nervoso simpatico

SPN: premotoneuroni simpatici

SWA: attività ad onde lente dell'elettroencefalogramma

Ta: temperatura ambientale

Tc: temperatura corporea

Thy: temperatura ipotalamica

TMN : nucleo tubero mammillare

UCP1: proteina disaccoppiante 1

VAT: area ventrale tegmentale

VGLUT3: trasportatore vescicolare del glutammato di tipo 3

VLPO: area preottica ventrolaterale

VMH: ipotalamo ventromediale

RIASSUNTO

Obiettivo della tesi è stato quello di studiare il ruolo svolto dall'ipotalamo laterale (LH) nella regolazione dei processi di integrazione dell'attività autonoma e termoregolatoria con quella degli stati di veglia e sonno.

A questo scopo, l'attività dell'LH è stata inibita per 6 ore (Esperimento A) mediante microiniezioni locali dell'agonista GABA_A muscimolo nel ratto libero di muoversi, nel quale sono stati monitorati in continuo l'elettroencefalogramma, l'elettromiogramma nucale, la pressione arteriosa (PA) e la temperatura ipotalamica (Thy) e cutanea. Gli animali sono stati studiati a temperatura ambientale (Ta) di 24°C e 10°C.

I risultati hanno mostrato che l'inibizione acuta dell'LH riduce l'attività di veglia e sopprime la comparsa del sonno REM. Ciò avviene attraverso l'induzione di uno stato di sonno NREM caratterizzato da ipersincronizzazione corticale, con scomparsa degli stati transizionali al sonno REM. Quando l'animale è esposto a bassa Ta, tali alterazioni si associano a un ampio calo della Thy, che viene compensato da meccanismi vicarianti solo dopo un paio d'ore dall'iniezione.

Sulla base di tali risultati, si è proceduto ad un ulteriore studio (Esperimento B) volto ad indagare il ruolo del neuropeptide ipocretina (prodotto in modo esclusivo a livello dell'LH) nei processi termoregolatori, mediante microiniezioni del medesimo nel bulbo rostrale ventromediale (RVMM), stazione cruciale della rete nervosa preposta all'attivazione dei processi termogenetici. La somministrazione di ipocretina è stata in grado di attivare la termogenesi e di potenziare la comparsa della veglia, con concomitante lieve incremento della PA e della frequenza cardiaca, quando effettuata alle Ta di 24°C o di 10°C, ma non alla Ta di 32°C.

In conclusione, i risultati indicano che l'LH svolge un ruolo cruciale nella promozione degli stati di veglia e di sonno REM e, per tramite dell'ipocretina,

interviene in modo complesso a livello del RVMM nella regolazione dei processi di coordinamento dell'attività di veglia con quella termoregolatoria.

INTRODUZIONE

1. CICLO VEGLIA-SONNO

1.1 NEUROFISIOLOGIA DEL SONNO

Il sonno può essere definito come un processo neurofisiologico e neurochimico estremamente complesso che mostra dipendenze e interazioni con l'ambiente circostante. Grazie agli studi condotti negli ultimi ottanta anni è stato possibile dimostrare che il sonno non è semplicemente l'assenza di veglia, bensì una specifica attività del cervello controllata da meccanismi precisi ed elaborati (Hobson, 1989).

I primi studi condotti sul sonno ne sottovalutarono l'importanza poiché si riteneva erroneamente che solamente la veglia costituisse uno stato attivo del cervello. Molti ricercatori, infatti, ritenevano che le cellule del cervello fossero disattivate durante il sonno. Verso la fine del secolo XIX si cominciò a considerare l'idea che fosse la parte più caudale dell'encefalo a stimolare la veglia e fu avallata l'ipotesi secondo la quale sia il sonno che la veglia potessero essere controllati attivamente dal tronco dell'encefalo. Il neurofisiologo Constantine von Economo per primo sostenne l'ipotesi che il tronco dell'encefalo contenesse un centro per la regolazione della veglia ed uno per il sonno. Egli intuì quindi che sia il sonno che la veglia erano mediati attivamente dall'encefalo e che il sonno quindi non era semplicemente uno stato di "assenza di veglia" (vedi paragrafo: Controllo centrale del sonno).

Agli inizi del '900 i progressi tecnologici permisero ai ricercatori di misurare l'attività elettrica cerebrale. Lo psichiatra Hans Berger nel 1928 registrò l'attività elettrica continua dal cuoio capelluto di individui umani. Egli ritenne che i segnali registrati, da lui definiti elettroencefalogramma (EEG), originassero dal cervello e non dalla pelle o dai muscoli. Berger osservò inoltre che l'andamento del segnale cambiava sensibilmente quando i soggetti chiudevano gli occhi, erano assonnati o dormivano.

Nel 1929 Nathaniel Kleitman formulò una teoria secondo la quale il sonno era dovuto ad una riduzione o ad un'abolizione delle afferenze sensoriali periferiche in grado di mantenere lo stato di veglia. Lo stato di sonno veniva quindi interpretato come una conseguenza della riduzione della stimolazione visiva e, pertanto, come la veglia, anche il sonno era considerato un processo passivo regolato dall'esterno.

Fu in seguito ad esperimenti condotti negli anni Trenta che venne dimostrato che l'alternanza tra sonno e veglia era causata solo dall'attività intrinseca del tronco dell'encefalo e non da stimoli sensoriali.

Nel 1950 venne definitivamente scartato il concetto di sonno come assenza di veglia o di attività. Si arrivò alla conclusione che la differenza tra sonno e veglia è dovuta all'attività intrinseca del tronco dell'encefalo: segnali elettrici provenienti dall'interno dell'encefalo sono in grado di produrre ciascuno stato a seconda del loro sito di origine e della loro frequenza (Moruzzi & Magoun, 1949). Sia il sonno che la veglia sono quindi processi attivi che coinvolgono aree specializzate del cervello che operano con meccanismi di inibizione reciproca, come verrà descritto, in maniera più approfondita, in seguito.

Durante il sonno si presenta una temporanea riduzione della risposta agli stimoli esterni. Tale disconnessione sensoriale dall'ambiente esterno è accompagnata ad una serie di modificazioni elettroencefalografiche e vegetative che identificano il sonno come un'attività tipica dell'encefalo controllata da meccanismi elaborati e meticolosi (Parmeggiani, 1968). Inoltre, la complessità della regolazione del sonno è tale che anche l'aspetto dell'esperienza soggettiva deve essere considerata. Possiamo pertanto definire il sonno come un'interazione tra componenti neurofisiologiche e neurochimiche e fattori comportamentali e culturali (Mancia, 1993).

Il sonno è quindi uno stato caratterizzato da condizioni ben definite (relativa immobilità, postura distesa o rilassata, ridotta sensibilità agli stimoli sensoriali) che si estende per un periodo di tempo limitato e che si ripete ciclicamente.

Il ciclo veglia-sonno, come la secrezione di molti ormoni e la temperatura corporea (T_c) è un esempio di ritmo regolato su base circadiana, ovvero con una durata di circa 24 ore. Nel corso della giornata si osservano, pertanto, momenti più o meno propizi per la comparsa della veglia e del sonno. Sulla base della prevalenza della veglia nelle ore di luce o di buio, le specie vengono definite diurne (quali l'Uomo) o notturne (quali il ratto o il topo). Nonostante ciò, il sonno può essere presente nell'Uomo e nell'animale in ogni momento, purché l'ambiente offra condizioni propizie per la sua comparsa. Le condizioni ambientali, infatti, possono fortemente influenzare il sonno. Tra queste, la luce e la temperatura hanno indubbiamente la capacità di modificare il sonno di molti mammiferi: ad esempio, nel ratto la riduzione o l'aumento della temperatura ambientale (T_a) riducono o accrescono, rispettivamente, in modo significativo la quantità di sonno (Heller 2005, Parmeggiani 2003). L'effetto dell'ambiente può esercitarsi su tutte le fasi del sonno.

Pertanto, nei mammiferi la regolazione del ciclo veglia-sonno dipende dall'andamento di stimoli esterni, tuttavia, in seguito alla rimozione di tali stimoli, si ha la persistenza di un ritmo endogeno di circa 12 ore di riposo/attività, di veglia/sonno, e di temperatura corporea. Il ritmo circadiano è mantenuto da un orologio biologico (pacemaker) collocato nel nucleo soprachiasmatico (SCN). Tale nucleo è situato nell'ipotalamo anteriore al di sopra del chiasma ottico, ovvero il punto in cui parte dei neuroni provenienti dalla retina si incrociano nel loro percorso verso i corpi genicolati laterali contra-laterali. Il SCN è sensibile a stimoli esterni (luce-buio) e a fattori interni come le variazioni ormonali e della temperatura corporea. Questo orologio circadiano

non è solo coinvolto nella distribuzione del sonno, ma sembra anche influenzare la propensione al sonno supportandolo o inibendolo nel momento giusto del giorno. In particolare il SCN regola due gruppi di aree cerebrali (Laposky, 2008), responsabili del regolare alternarsi di veglia e di sonno: il sistema reticolare attivante responsabile del mantenimento dello stato di veglia localizzato nella parte rostrale del tronco dell'encefalo e nell'ipotalamo posteriore e il sistema ipotalamico del sonno localizzato nell'ipotalamo anteriore che favorisce la comparsa dello stato di sonno.

L'addormentamento richiede che l'attività dei sistemi attivanti e favorenti la veglia si riduca, grazie ad una minore stimolazione sensoriale e all'inibizione di questi gruppi neuronali ad opera dei neuroni che costituiscono il sistema ipotalamico del sonno (Tononi e Cirelli, 2005). Bisogna in particolare porre attenzione al nucleo preottico ventrolaterale dell'ipotalamo (VLPO) che inibisce la zona monoaminergica del sistema ascendente del risveglio e le regioni ipotalamiche attivanti, come l'ipotalamo laterale (LH) ed il nucleo tubero mammillare (TMN) tramite un set di neuroni secernenti neurotrasmettitori inibenti come la galanina e il GABA. Al contrario, durante la veglia, i nuclei che la promuovono inibiscono il VLPO (vedi paragrafo: Controllo centrale del sonno). Questo meccanismo di mutuale inibizione, che è stato proposto come responsabile del passaggio tra lo stato di veglia e di sonno, garantirebbe la stabilità degli stati di veglia e di sonno e l'instabilità degli stati transizionali (meccanismo flip-flop) (Saper et al., 2005).

La funzione del sonno resta ancora controversa, ma è evidente che ha una funzione ristoratrice sul sistema nervoso. Una prova fondamentale della sua importanza biologica è data dal fatto che tutte le specie animali fino ad ora studiate dormono e gli animali dormono anche in situazioni in cui è potenzialmente pericoloso, nonostante il sonno sia una condizione caratterizzata da estrema vulnerabilità (Zeppelin, 2005). Gli

animali aumentano la loro sopravvivenza trovando un posto sicuro in cui dormire e usano il sonno per ottimizzare il risparmio energetico riducendo il consumo di energia sia a livello cerebrale che corporeo. Proprio per questo motivo la scelta del luogo in cui dormire non è casuale, ma specie-specifica in base al modo di vivere e all'organizzazione sociale. Inoltre, la deprivazione di sonno estremamente prolungata (> 2 settimana) nel ratto produce una particolare sindrome caratterizzata da una profonda disregolazione metabolica. La sindrome, che si rivela fatale, produce una significativa perdita di peso, associata ad un importante incremento dell'assunzione di cibo e ad una drastica diminuzione della temperatura corporea (Rechtschaffen et al., 1989). Questi dati suggeriscono un ruolo vitale per la funzione del sonno e che il mantenimento di una corretta regolazione delle funzioni metaboliche sia in qualche modo un oggetto di tale funzione.

1.2 SONNO NREM E SONNO REM

Il sonno in base alle variazioni evidenziate dalle registrazioni polisonnografiche (elettroencefalogramma, EEG ed elettromiogramma, EMG) e sulla base della presenza o assenza di movimenti oculari è stato classificato in 2 fasi definite sono non-REM (NREM) (anche sonno sincrono o a onde lente) e sonno REM (anche sonno desincronizzato o sonno attivo). Nella specie umana il sonno NREM è ulteriormente suddiviso in 4 fasi (I-IV).

Il ciclo di sonno è composto dall'alternarsi su base ultradiana di episodi di sonno NREM e di sonno REM, con una periodicità che varia nelle diverse specie in funzione delle dimensioni corporee e cerebrali e dell'attività metabolica. La durata del ciclo è di circa 12 minuti nel ratto, 30 minuti nel gatto, fino a raggiungere i 90-120 minuti nell'Uomo, dove il ciclo si ripete quattro o cinque volte nell'arco della notte (Horne,

2000). In ogni ciclo, la durata del sonno NREM copre in media il 75-80% del medesimo. Nell’Uomo, il sonno NREM prevale nel primo periodo della notte mentre la durata del sonno REM aumenta nella seconda metà della notte.

In un individuo adulto l’EEG della veglia vigile è caratterizzato da ritmi (Beta e Gamma) che presentano oscillazioni ad alta frequenza e a basso voltaggio. Quando il soggetto chiude gli occhi e si prepara ad addormentarsi compaiono nel tracciato EEG, soprattutto nelle regioni posteriori, onde con una frequenza minore, ma con un voltaggio più alto (ritmo alfa) che potrebbero corrispondere ad uno stato di riposo delle aree visive poiché spariscono quando il soggetto riapre gli occhi. Il passaggio dalla veglia al sonno avviene attraverso uno stadio di transizione denominato stadio I, caratterizzato dalla scomparsa delle onde alfa e dalla comparsa di onde Theta a basso voltaggio e a frequenza mista. In questo stadio la capacità di rispondere agli stimoli esterni è ridotta, i movimenti oculari rallentano e il tono muscolare si riduce. Lo stadio I dura pochi minuti ed è subito seguito da un secondo stadio caratterizzato dalla comparsa di un’onda acuta negativa di grande ampiezza seguita da una positiva ad ampiezza lenta denominata complesso K e da oscillazioni di ampiezza crescente e decrescente che prendono il nome di fusi del sonno (o spindles) che sanciscono che il soggetto è realmente addormentato. Durante questo stadio i movimenti oculari e il tono muscolare sono ridotti. Allo stadio II fanno seguito le fasi III e IV, soprattutto nella prima parte della notte, caratterizzate dalla presenza di onde ampie e lente (ritmo Delta) che corrispondono alla parte più profonda del sonno, con movimenti oculari lenti e rilassamento muscolare. Dopo un progressivo crescendo di profondità di sonno (Rechtschaffen and Kales, 1968) questo torna ad alleggerirsi e ritorna alla fase II per poi sfociare nel REM. Il sonno a onde lente indicato come sonno NREM (non rapid eye

movement sleep) è indice della riduzione della frequenza e della sincronizzazione della scarica neurale.

Il sonno REM è una fase caratterizzata da aspetti del tutto particolari che si discostano da quelli del sonno NREM. Sebbene caratterizzi uno stadio abbastanza profondo del sonno, dove si riscontra una soglia del risveglio inferiore solo a quelle dello stadio IV, paradossalmente è caratterizzato da ritmi EEG simili a quelli della veglia, ed è stato pertanto definito anche sonno “paradosso”. Questi ritmi sono anche accompagnati da ampi potenziali fasici che dal ponte genicolato occipitale raggiungono la corteccia occipitale (Mancia, 1993). Il sonno REM si manifesta attraverso due componenti: una tonica e l'altra fasica. La componente tonica presente per tutta la durata del sonno REM, è composta dalla desincronizzazione dell'EEG e da completa atonia posturale. Quella fasica è descritta dalla comparsa di movimenti oculari rapidi (da cui il termine REM, rapid eye movement), dalle onde fasiche ponto-genicolo occipitali, da brevi mioclonie degli arti (twitches) e da ampie modificazioni fasiche dell'attività vegetativa circolatoria e respiratoria (Zamboni et al., 1999). Durante il sonno REM l'attività onirica raggiunge la sua massima espressione.

1.3 OMEOSTASI DEL SONNO

Un ruolo importante nella regolazione del ciclo veglia-sonno è assunto dal fenomeno che è stato definito omeostasi del sonno. In termini generali, per omeostasi si intende un processo complesso e coordinato che ha lo scopo di mantenere entro un certo rango di valori di riferimento le variabili fisiologiche vitali. Qualora si rilevino deviazioni da questi valori di riferimento, si innescano cambiamenti compensatori che perdurano fino a che non viene raggiunto nuovamente il valore di riferimento. L'omeostasi fisiologica è mantenuta da processi a feed-back negativo o a feed-forward

che minimizzano o prevengono, rispettivamente, variazioni delle variabili legate a influenze esterne o interne all'organismo (Parmeggiani, 2005).

L'aspetto omeostatico nel processo ipnico è dato dal fatto che in seguito a privazione di sonno aumenta la propensione al sonno, mentre un eccesso di sonno la riduce. Tale concetto è stato formalizzato negli anni '80 del secolo scorso (Borbely, 1980), tuttavia, già in precedenza, diversi studi condotti effettuando privazioni selettive di sonno, al fine di definire gli stati comportamentali su base elettroencefalografica, permisero di osservare, nel periodo successivo alla privazione, la comparsa di una quota compensatoria di sonno (Dement, 1960; Khazan e Sawyer, 1963; Jouvet et al., 1964; Morden et al., 1967)

La quantità e l'intensità del sonno risultano quindi influenzate oltre che dall'aspetto circadiano anche dalla durata e dall'intensità della veglia precedente (Achermann e Borbely, 2010). Quindi, più si sta svegli, maggiore è il successivo bisogno di dormire. La privazione di sonno è seguita, infatti, da un aumento compensatorio della durata e dell'intensità del sonno, con un aumento della soglia per il risveglio e minore frammentazione del sonno. Questo si osserva con modalità diverse sia nel sonno NREM, sia nel sonno REM.

Dopo la privazione di sonno, il sonno successivo è caratterizzato da un modesto aumento della quantità di sonno NREM (in particolar modo nelle fasi S3 e S4 dell'uomo) e da un aumento dell'intensità dello stesso, ovvero un aumento della quantità e dell'ampiezza delle onde lente nel tracciato EEG, che vengono misurate attraverso la potenza della banda Delta dell'EEG. In diverse specie di mammiferi è stato dimostrato che la potenza Delta nel sonno NREM dipende dalla durata e dall'intensità della veglia precedente; questo avviene sia nel ratto (Tobler e Borbely, 1986) che nell'uomo (Dijk et al., 1990). Inversamente, esperimenti condotti sull'uomo in individui

che effettuavano brevi periodi di sonno durante il giorno, hanno mostrato un picco notturno di potenza Delta più basso, poiché una parte della propensione al sonno, accumulatasi durante la veglia, era stata “spesa” durante i periodi di sonno pomeridiano (Feinberg et al., 1985; Werth et al., 1996).

Nonostante un incremento dell’attività Delta sia stato riscontrato in diverse specie (ratto: Trachsel et al., 1988; gatto: Tobler e Scherschlicht, 1990; coniglio: Tobler et al., 1990, Opp et al., 1997), l’aspetto più eclatante dell’omeostasi ipnica nell’animale di laboratorio è costituita dal successivo incremento del sonno REM, che presenta una finissima regolazione sul piano omeostatico. Infatti, nei piccoli roditori e nel gatto, in seguito a deprivazione di sonno si ha un aumento della quantità del sonno REM che risulta proporzionale alla quantità persa (Amici et al., 2008). Tale recupero è principalmente legato a un aumento della frequenza degli episodi. Anche la potenza Theta dell’EEG aumenta durante gli episodi di sonno REM che avvengono durante il periodo di recupero, ma non è chiaro quanto questo aumento contribuisca al recupero stesso (Cerri et al., 2005; Amici et al., 2008)

La regolazione omeostatica del sonno REM potrebbe dipendere dall’accumularsi durante il sonno NREM precedente di una propensione specifica (Benington e Heller, 1994), ma gli esperimenti più recenti indicano che tale propensione dipende solamente dalla quantità di sonno REM perduto (Vivaldi et al., 1994; Endo et al., 1998; Amici et al., 2008). Con una deprivazione totale o selettiva di sonno REM condotta ad oltranza (per circa tre settimane), si è osservata, nel ratto, la comparsa di una sindrome metabolica specifica che conduce a morte gli individui (Rechtschaffen et al., 1983) e che è caratterizzata dalla comparsa di un’ipotermia irriducibile nonostante il notevole aumento dell’ingestione di cibo; soltanto il recupero di sonno, che è pressoché interamente dovuto al sonno REM anche nelle deprivazioni totali, impedisce il decesso

dell'animale (Everson et al., 1989; Tsai et al., 1992; Feng et al., 1995). Questi esperimenti terminali sono interpretati come indicazione che una delle possibili funzioni del sonno REM sia quella di mantenere il corretto funzionamento dei circuiti cerebrali di regolazione della spesa metabolica (Rechtschaffen, 1998).

1.4 SONNO E MASSA CORPOREA

La quantità quotidiana di sonno, così come la durata e la frequenza delle fasi di sonno sono differenti nelle diverse specie di mammiferi. La quantità di sonno tende a essere maggiore nei carnivori rispetto agli erbivori, ma all'interno dei diversi gruppi è nota una proporzionalità inversa tra peso corporeo e quantità media di sonno giornaliero. Animali di piccola taglia come il pipistrello e l'opossum possono dormire mediamente 18-20 ore al giorno, mentre elefanti e giraffe dormono in media 3-4 ore al giorno.

Come già detto, esiste una correlazione tra massa corporea e durata del ciclo di sonno; ad esempio, questa è di circa 8 minuti nel toporagno, mentre raggiunge 1,8 ore nell'elefante (Siegel, 2005, Amici et al., 2008). Nell'Uomo il ciclo dura 90-110 minuti e si ripete 4-5 volte nell'arco di una notte (Tononi e Cirelli, 2005), le fasi REM della mattina sono generalmente le più lunghe. Nel ratto, invece, la lunghezza del ciclo è di 12 minuti (Zepelin e Rechtschaffen, 1974).

Anche la distribuzione giornaliera di sonno varia nelle diverse specie. Negli Uomini adulti, ad esempio, il sonno è tendenzialmente concentrato in un singolo periodo della giornata (sonno monofasico), anche se è possibile effettuarne brevi episodi nel corso della giornata. Nella maggior parte dei casi il sonno dei mammiferi è invece polifasico con la comparsa di più gruppi di cicli di sonno separati da periodi di veglia di lunghezza variabile.

Anche la quantità di sonno REM che deve essere persa per innescare un processo di recupero apprezzabile si modifica secondo questo parametro (Amici et al., 2008). Ciò spiegherebbe perché l'intensità del recupero del sonno REM a parità di durata della deprivazione precedente risulti maggiore nel ratto, intermedia nel gatto e più debole nell'Uomo. Il ruolo che le dimensioni corporee e quindi la modificazione del rapporto superficie/volume e della velocità del metabolismo hanno sulla regolazione della durata del ciclo di sonno e sulla sua dinamica omeostatica, suggerisce ancora una volta come vi sia un profondo legame fra la regolazione del metabolismo corporeo e la fenomenologia ipnica.

1.5 SONNO E TEMPERATURA

Sia la temperatura corporea (T_c) che la temperatura ambientale (T_a) hanno forti influenze sull'espressione e sull'architettura del sonno (Parmeggiani, 2003; Heller, 2005). La T_c è regolata a livelli più bassi durante il sonno NREM rispetto alla veglia. La comparsa di sonno NREM, infatti, si accompagna ad una riduzione dei processi metabolici, il che è messo in evidenza da una diminuzione dell'attività cardiaca in concomitanza con la riduzione della T_c centrale e con l'aumento della temperatura cutanea (indice di una vasodilatazione periferica che favorisce la riduzione della T_c (Obàl F Jr et al., 1985, Parmeggiani 2003).

La riduzione dei processi metabolici che si riscontra durante il sonno NREM sembra mediata da un controllo termoregolatorio che si attiva prima della comparsa del sonno. Pertanto, sembra che il calo dell'attività metabolica sia un requisito importante al fine di creare un adeguato substrato fisiologico che permetta l'ingresso in uno stato di sonno. Il sonno si correla quindi con il risparmio energetico sia indirettamente, sia direttamente. Per via indiretta, in quanto la riduzione stessa dell'attività che si

manifesta nel corso di una fase di sonno comporta un calo della spesa metabolica; per via diretta, poiché sembra che il sonno influenzi direttamente i centri di controllo termoregolatori determinando di conseguenza una diminuzione della spesa energetica. La conservazione dell'energia può essere particolarmente importante per animali di piccole dimensioni e per i neonati in quanto il loro alto rapporto superficie/massa corporea è ideale per la perdita di calore. Ciò rende la riduzione della spesa energetica che accompagna il sonno di grande importanza. Il rapporto inversamente proporzionale esistente tra quantità di sonno e massa dell'animale contribuisce ulteriormente a rafforzare l'idea che il processo sonno sia in un certo modo correlato al controllo della spesa energetica (Amici et al., 2008).

È stato dimostrato che l'esposizione di animali (ratti) a bassa temperatura ambientale riduce la comparsa del sonno REM normalmente espressa in questa specie di un valore che risulta proporzionale al calo della medesima, fino alla soppressione del sonno REM medesimo (Parmeggiani 2003; Cerri et al., 2005). Si è evidenziato infatti un importante effetto dell'esposizione al freddo sull'architettura del sonno e sull'attività elettroencefalografica. Pertanto, l'esposizione degli omeotermi ad una T_a al di fuori del rango di termoneutralità è utilizzato come metodo fisiologico di riduzione del sonno.

L'esposizione ad una T_a al di fuori dei normali valori di termoneutralità comporta cambiamenti nella quantità e nella distribuzione dei differenti stadi del ciclo veglia-sonno in diverse specie. Questi cambiamenti sono la conseguenza delle diverse capacità di regolare la T_c attraverso i diversi stadi del ciclo veglia-sonno (Parmeggiani et al., 1980).

Studi condotti sul gatto hanno evidenziato che un'esposizione a breve termine a T_a basse differenti primariamente influenza la comparsa di sonno REM. In particolare, la diminuzione della comparsa di episodi di sonno REM è proporzionale alla

diminuzione della Ta a cui gli animali sono esposti. L'esposizione ad una bassa Ta influenza in maniera evidente la comparsa di sonno anche quando agli animali è concesso successivamente il recupero alla normale Ta di laboratorio. Nello specifico è stato osservato nel gatto un recupero di sonno REM proporzionale alla precedente perdita (Parmeggiani et al., 1980).

Studi più recenti condotti sui ratti confermano queste osservazioni. Si è infatti visto che sia la perdita di sonno REM che il successivo recupero sono legati quantitativamente alla durata dell'esposizione e all'intensità di abbassamento della Ta (Amici et al. 1994; Zamboni et al. 2001, Cerri et al., 2005).

La veglia è incrementata dall'esposizione al freddo, mentre effetti più complessi si sono osservati sul sonno NREM (Sichieri e Schmidek, 1984). Esso risulta meno depresso rispetto al REM ed inoltre l'ammontare del sonno NREM è meno influenzato durante il recupero, infatti non ne è stato registrato un aumento sostanziale né nel ratto, né nel gatto (Frenken et al., 1993). Tuttavia l'esposizione al freddo comporta un calo della potenza della banda Delta, mentre durante il recupero si osserva un incremento nella potenza della banda stessa (Cerri et al., 2005). Il sonno NREM è quindi più influenzato dalle basse temperature in termini di intensità piuttosto che in termini di durata (Cerri et al., 2005).

1.6 CONTROLLO NERVOSO CENTRALE DEL SONNO

Il controllo centrale dell'alternanza degli stati del ciclo veglia-sonno è molto complessa, coinvolgendo molte aree cerebrali (Saper et al. 2005; Fort et al., 2009; Fisher et al., 2013, Tortorella et al., 2013). Fra queste, la descrizione del ruolo dell'LH nella regolazione della funzione ipnica è riportata nel capitolo dedicato a questa area cerebrale.

Fra le molte funzioni che supervisiona, l'ipotalamo è profondamente coinvolto nella regolazione della comparsa degli stati del ciclo veglia-sonno, promuove specifici comportamenti e coordina le attività somatiche, autonome ed endocrino-motorie sulla base delle informazioni sensoriali esterne ed interne. L'ipotalamo ha un ruolo chiave in questa complessa attività integrativa, ovvero risulta avere un ruolo cruciale nel mantenimento dell'omeostasi corporea e nella riproduzione (Hess, 1954). Le funzioni fisiologiche differenti, come la termoregolazione, l'osmoregolazione, la regolazione del bilancio energetico, e il controllo autonomo cardiovascolare sono strettamente connesse e condividono comuni substrati ipotalamici con la regolazione degli stati di sonno-veglia. Già nei primi anni del 1900 von Economo notò che in alcuni pazienti affetti da 'encefalite letargica', l'insonnia era il sintomo prominente e che in alcuni casi, le lesioni erano localizzate nell'ipotalamo anteriore, incluso la POA (area preottica). Queste osservazioni hanno portato von Economo ad ipotizzare l'esistenza di un centro del sonno nell'ipotalamo anteriore (von Economo, 1929). Successivamente Nauta mostrò che la disconnessione dell'ipotalamo anteriore e del POA dal diencefalo portava i ratti ad un'insonnia apparentemente irreversibile (Nauta, 1946). Il ruolo del POA nell'induzione del sonno è stata poi confermata da studi neurofisiologici nei gatti (Serman and Clemente, 1962).

Recenti studi di immunoistochimica sull'espressione dei c-Fos hanno permesso alcune ricerche volte a localizzare i neuroni putativi regolatori del sonno sia nel nucleo preottico ventrolaterale (VLPO) (Sherin et al., 1996), sia nel nucleo preottico mediano (MePO) (Gong et al., 2004). Studi successivi hanno evidenziato il ruolo centrale dei neuroni del VLPO nel mantenimento del sonno e dei neuroni del MePO nel passaggio veglia-sonno e nell'omeostasi del sonno (Szymusiak et al., 2008; Denticò et al., 2009). Il VLPO e il MePO sono reciprocamente connessi ai gruppi neuronali della veglia, come i

neuroni istaminergici nel nucleo tuberо mammillare (TMN), i neuroni serotoninergici nei nuclei del raphe dorsale (DRN), i neuroni noradrenergici nel locus coeruleus (LC), i neuroni ipocretinergici nell'area perifornicale del LHA, i neuroni colinergici nei nuclei laterodorsali e peduncolo pontini (LDT/PPT) e il nucleo basale del prosencefalo (Fort et al., 2009). Il VLPO e il SCN (nucleo soprachiasmatico) sono connessi, in modo che l'informazione circadiana possa modulare l'attività neuronale del VLPO. Durante la veglia i neuroni del VLPO sono inibiti da input noradrenergici, serotoninergici e colinergici, mentre al contrario l'istamina e l'ipocretina non modulano, almeno apparentemente, l'attività neuronale del VLPO (Chou TC et al., 2002). Va notato inoltre che i neuroni del TMN potrebbero inibire i neuroni del VLPO perché rilasciano GABA. Durante il sonno, i neuroni del VLPO GABergici e galaninergici ed i neuroni del MePO GABergici inibiscono la veglia agendo sui neuroni monoaminergici e ipocretinergici (Szymusiak et al., 2008).

La reciproca interazione inibitoria di questi sistemi può dar luogo a un meccanismo per il mantenimento dello stato di veglia (Saper et al., 2001). I neuroni preottici che promuovono il sonno sono attivati da fattori ipnogenici (Szymusiak et al., 2008) come prostaglandine D2, interleuchina 1-beta, e adenosina che agiscono direttamente sui recettori postsinaptici A2A nei neuroni della VLPO (McGinty et al., 2001). Inoltre, l'adenosina può inibire direttamente i neuroni che promuovono la veglia ed anche la produzione di acetilcolina e ipocretina. L'originale osservazione di von Economo ovvero che in alcuni pazienti affetti da 'encefalite letargica', una lesione dell'ipotalamo posteriore era associata ad una diminuzione del livello di vigilanza, rappresenta la prima chiara indicazione che questa regione ipotalamica contiene neuroni importanti per il mantenimento della veglia.

Per quanto riguarda la regolazione del sonno REM, i dati più recenti (Luppi et al., 2013) indicano che nel ratto un gruppo di neuroni glutamatergici attivi selettivamente durante il sonno REM (REM-on) collocati nel nucleo sublaterodorsale del tegmento pontino (SLD) sarebbero responsabili dell'attivazione corticale, anche attraverso proiezioni ai neuroni dei nuclei peduncolo pontino (PPT) e del tegmento laterodorsale (LDT), e della atonia muscolare attraverso una via discendente che proietta a neuroni GABAergici/glicinerici collocati nel nucleo reticolare ventrale bulbare che andrebbero a loro volta ad inibire i motoneuroni alfa troncoencefalici e spinali. Questi neuroni sarebbero tonicamente inibiti durante il sonno NREM da una via discendente a provenienza da neuroni REM-off collocati nel grigio periacqueduttale ventrolaterale del mesencefalo, che a loro volta verrebbero inibiti nel sonno REM da neuroni MCH/GABAergici collocati nell'ipotalamo laterale (vedi capitolo: Ipotalamo laterale e sonno).

2. TERMOREGOLAZIONE

2.1 SCAMBIO DI CALORE TRA ORGANISMO E AMBIENTE

La termoregolazione è un meccanismo fisiologico il cui scopo è quello di mantenere costante la temperatura corporea (T_c) adattando il flusso di calore fra l'organismo e l'ambiente in modo da contrastare i cambiamenti della temperatura ambientale (T_a).

Per consentire il mantenimento di una temperatura costante è necessario essere in grado di regolare sia la produzione e/o conservazione del calore, sia la sua dispersione. Per poter attuare questi processi di generazione, mantenimento e

dispersione del calore bisogna disporre di particolari organi effettori che siano in grado di attuare queste risposte.

I processi fisici che descrivono il flusso di calore fra un corpo e l'ambiente sono:

- irraggiamento: trasferimento di calore fra due corpi per mezzo di onde elettromagnetiche;
- conduzione: trasmissione di calore fra due solidi per contatto diretto dal corpo a più alta temperatura verso quello a temperatura inferiore;
- convezione: passaggio di calore tra un fluido e un corpo che presentano temperature diverse fra loro;
- evaporazione: il passaggio di stato della materia da liquido a gassoso;

Mentre tramite le prime tre modalità il calore può fluire dall'ambiente all'organismo e viceversa, l'evaporazione consente flusso termico solo dall'organismo all'ambiente. Infatti, perché l'evaporazione avvenga è necessario fornire calore al liquido che verrà quindi trasferito all'ambiente, una volta che il liquido sarà passato in fase aeriforme.

Sulla base di questi processi di scambio termico si sono evolute diverse modalità termoregolatorie che nei mammiferi hanno contribuito alla formazione di organi e strategie specializzate per questo scopo. In merito a questo possiamo distinguere due principali forme di termoregolazione:

- termoregolazione comportamentale: quando è coinvolta l'attività volontaria dell'animale;
- termoregolazione non comportamentale: quando essa non dipende da un'azione volontaria, ma viene gestita dal sistema nervoso autonomo.

2.2 TERMOREGOLAZIONE COMPORTAMENTALE

Con il termine termoregolazione comportamentale si identificano un insieme di azioni intraprese dall'animale che hanno lo scopo di mantenere la T_c entro limiti fisiologici, fra cui lo spostamento dell'animale verso aree termicamente più favorevoli, così come l'uso di strategie che favoriscano la normale dispersione o conservazione del calore (diffusione termica tramite salivazione o aggiustamenti posturali). Questa strategia termoregolatoria è filogeneticamente più antica e nasce negli organismi pecilotermi, che sono obbligati a utilizzarla mancando di ulteriori meccanismi intrinseci di regolazione; gli anfibi, ad esempio, che passano continuamente da un ambiente all'altro per mantenere stabile la loro T_c , oppure alcune specie di rettili che utilizzano l'energia radiante, esponendosi al sole e mantenendo il corpo a contatto con la terra. Anche gli animali omeotermi, nonostante dotati di strategie termoregatorie più sofisticate, sfruttano, quando adeguati, questi meccanismi, poiché richiedono una minore spesa energetica rispetto ai più recenti meccanismi fisiologici sviluppatasi negli omeotermi. Infatti alcuni animali coperti da pelliccia, quando esposti ad alte temperature, cospargono il loro corpo di saliva, consentendo quindi la dispersione di calore per evaporazione. Questo comportamento viene definito saliva-spreading. Un'altra strategia di termoregolazione comportamentale è data dagli aggiustamenti posturali che contribuiscono, aumentando o diminuendo la superficie corporea esposta all'aria, nel disperdere o conservare la temperatura corporea.

2.3 TERMOREGOLAZIONE NON COMPORTAMENTALE

Questa modalità termoregolatoria si basa sulla regolazione della temperatura corporea per mezzo di sistemi autonomici che non prevedono un'azione di tipo volontario. Anche se recenti studi hanno mostrato in alcuni rettili e pesci la possibilità di una termoregolazione autonoma, questi restano tuttavia principalmente dipendenti da

una termoregolazione di tipo comportamentale (Bicego et al., 2007). Si può quindi affermare che le uniche classi animali che posseggono una termoregolazione autonoma sono i mammiferi e gli uccelli. Questi animali omeotermi, oltre a possedere la capacità di controllare e regolare la propria temperatura corporea in maniera autonoma, hanno anche, rispetto alle altre classi animali, una temperatura corporea più elevata.

Le risposte termoregolatorie autonome messe in atto da questi animali possono essere divise in due categorie: risposte termoregolatorie evocate da esposizione ad ambienti freddi e risposte termoregolatorie evocate da esposizione ad ambienti caldi.

2.4 RISPOSTE EVOCATE DALL'ESPOSIZIONE AD AMBIENTI FREDDI

Coinvolgono quegli effettori termoregolatori che possiedono la caratteristica di conservare e/o produrre calore. In queste condizioni, la temperatura corporea viene quindi conservata per mezzo di un aumento della produzione di calore (termogenesi), che può vedere la presenza o assenza di brivido (termogenesi con o senza brivido, rispettivamente) e per mezzo di una riduzione della dispersione termica nell'ambiente (regolazione del flusso ematico cutaneo, piloerezione).

2.4.1 Meccanismi di aumentata produzione del calore

La produzione di calore può essere aumentata attraverso la termogenesi con brivido (shivering thermogenesis) e la termogenesi senza brivido (non-shivering thermogenesis).

La termogenesi con brivido è specifica degli animali omeotermi ed è caratterizzata dalla presenza del brivido come risposta immediata all'esposizione a basse T_a . Il brivido è un meccanismo di contrazione muscolare non finalizzata al

movimento, che inizia con singole contrazioni asincrone presentando solo in un secondo momento l'attivazione coordinata delle singole fibre muscolari scheletriche dando luogo al tremito vero e proprio. Il brivido produce calore in conseguenza della contrazione isometrica dei muscoli, i quali mantenendo costante la loro lunghezza, non generano lavoro meccanico e una maggior quantità di energia proveniente da ATP va sotto forma di calore. Questo processo è importante anche durante il rialzo termico negli stati febbrili.

La termogenesi senza brivido prevede la produzione di calore per mezzo di reazioni biochimiche esotermiche che avvengono in organi che hanno acquisito con l'evoluzione capacità termoregatorie. I principali organi coinvolti sono il tessuto adiposo bruno, il fegato e il muscolo striato scheletrico e cardiaco.

Il tessuto adiposo bruno è un tessuto reticolare definito anche ghiandola ibernante, che deriva da un' iperspecializzazione del muscolo striato embrionale. Si differenzia dal tessuto adiposo bianco per la sua pigmentazione bruna conferitagli dai carotenoidi mitocondriali e visibile anche ad occhio nudo. Le sedi anatomiche dove è maggiormente concentrato sono la zona interscapolare, periaortica e perirenale. La sua funzione è quella di generare calore, infatti lo si ritrova in prossimità di vasi sanguigni, a cui cede calore che viene trasportato, attraverso il flusso ematico, alle zone periferiche del corpo.

La capacità termogenica del BAT dipende dal disaccoppiamento della fosforilazione ossidativa, operato, a livello della membrana mitocondriale interna, dalla proteina disaccoppiante 1 (UCP1), attivata dagli acidi grassi rilasciati dalle gocce lipidiche. L'UCP1 è una proteina che forma un canale per il passaggio dei protoni; quando attivata, questi passano attraverso il canale e rientrano nella matrice attraverso UCP1 e non mediante l'ATP sintetasi. Nel BAT l'energia derivante dal gradiente

protonico attraverso la membrana mitocondriale è quindi disaccoppiata dalla produzione di ATP.

L'attività del BAT è controllata dall'ipotalamo attraverso il sistema nervoso simpatico. Il livello di attività simpatica diretta al BAT e, di conseguenza, il rilascio di noradrenalina, determina il livello di attività dell'organo stesso, regolando sia l'attività delle lipasi che forniscono le molecole indispensabili ai mitocondri, sia il livello di espressione di UCP1 mitocondriale (Cannon and Nedergaard, 2004). Anche i livelli plasmatici degli ormoni tiroidei (T3 e T4) risultano critici per la corretta funzionalità del BAT. Gli ormoni T3 e T4 sono inoltre in grado di stimolare la produzione di calore aumentando i processi metabolici cellulari in tutto l'organismo. L'esposizione a basse Ta, per esempio, stimola l'innalzamento di questi ormoni che porta all'immediata attivazione di meccanismi metabolici mitocondriali con conseguente aumento della produzione di calore.

Il fegato è un organo metabolicamente attivo e sede di innumerevoli processi esotermici. E' stato suggerito che in seguito ad esposizione a bassa Ta, l'attività metabolica del fegato possa contribuire alla generazione di calore, aumentando la velocità delle reazioni biochimiche negli epatociti.

Come precedentemente menzionato il muscolo striato scheletrico è in grado di produrre calore attraverso il brivido, ma recentemente sono state scoperte isoforme della proteina UCP1 all'interno delle sue cellule che lasciano supporre un ruolo termogenetico di origine metabolica. Resta comunque ancora da chiarire un possibile ruolo del muscolo nella termogenesi metabolica (Dulloo et al., 2001). L'attività cardiaca è soggetta ad un forte cronotropismo positivo durante l'esposizione a basse temperature ambientali. Questo sostiene le richieste metaboliche dei tessuti attivi in queste circostanze, ma è di per sé in grado di produrre una quantità non trascurabile di calore.

2.4.2 Meccanismi di aumentata conservazione del calore

L'organismo è in grado di ridurre la dispersione del calore nell'ambiente attraverso la riduzione del flusso ematico cutaneo e la piloerezione.

Il calore prodotto dagli organi termogenetici e quello derivante dai normali processi biochimici richiede un sistema di trasporto efficiente che ne garantisca la diffusione in tutto il corpo, ma che allo stesso tempo ne assicuri la conservazione o l'eventuale dispersione. Questo ruolo viene svolto dal sistema cardiovascolare. A tal fine, la branca del sistema nervoso autonomo deputata alla termoregolazione si è dovuta integrare con la componente autonoma, più antica, deputata alla regolazione della funzione cardiovascolare. In quest'ottica e in circostanze adeguate, le esigenze termoregulatorie possono prendere il sopravvento su quelle circolatorie, trasferendo così il controllo di alcune componenti del sistema cardiovascolare ai centri deputati al controllo della temperatura corporea.

Questo meccanismo termoregulatorio si differenzia dalla termogenesi, chimica o da brivido, principalmente per la sua capacità di poter sia disperdere che conservare calore, e non solo di aumentare la T_c come accade con gli altri meccanismi termoregulatori. Nei mammiferi, che hanno una T_c superiore agli organismi poecilotermini, la modulazione termoregulatoria del flusso cutaneo è estremamente importante in quanto protegge da pericolosi aumenti della temperatura cerebrale in ambienti caldi e permette di risparmiare il calore prodotto in ambienti freddi.

I centri termoregulatori agiscono sul sistema cardiovascolare sia modificando la frequenza cardiaca (FC), sia la pressione arteriosa (PA) attraverso le modificazioni del lume capillare. L'aumento della FC ha la duplice funzione di garantire la perfusione degli organi termogenetici (BAT), assicurando un maggior apporto di ossigeno durante

periodi di intensa attività, ed anche di aumentare il trasporto di calore prodotto da questi organi a tutti i distretti anatomici. Le variazioni del lume capillare, invece, garantiscono un aumento (vasodilatazione) o una diminuzione (vasocostrizione) del flusso ematico cutaneo periferico per permettere una maggiore dispersione o conservazione del calore corporeo. L'esposizione ad ambienti freddi causerà quindi vasocostrizione a livello cutaneo per conservare calore e contemporaneamente un aumento della frequenza cardiaca con conseguente aumento del trasporto di calore proveniente dagli organi termogenetici.

Alcuni distretti cutanei, chiamati scambiatori di calore, sono specificatamente dedicati alla regolazione dello scambio termico fra organismo e ambiente, come per esempio, le orecchie nel coniglio, la coda nel ratto, le mani e i piedi nell'uomo. Questi distretti sono contraddistinti dalla presenza di numerose anastomosi artero-venose (AVA), che adattano il flusso sanguigno alla necessità termica (Gordon, 1990). L'uso di queste strutture per una finalità termoregolatoria mostra inoltre il vantaggio di non essere dispendiosa a livello energetico. Il meccanismo di funzionamento, infatti, dipende solo dall'entità del flusso diretto verso le superfici di scambio. La diminuzione della temperatura cutanea stimola la contrazione della muscolatura liscia dei vasi sanguigni, aumentando la resistenza dei vasi cutanei e diminuendo quindi il flusso ematico alla cute; di conseguenza il sangue è allontanato dalle estremità e ridiretto alle strutture più interne del corpo, riducendo così la dispersione di calore per convezione.

Negli animali coperti da pelliccia la piloerezione (sollevamento dei peli) ottenuta grazie alla contrazione dei muscoli erettori del pelo contribuisce alla conservazione del calore corporeo attraverso la formazione di un cuscino di aria, tra la cute calda e l'ambiente freddo, che funziona da isolante termico.

2.5 RISPOSTE TERMOREGOLATORIE EVOCATE DALL'ESPOSIZIONE AD AMBIENTI CALDI

Le risposte termoregolatorie evocate dall'esposizione ad ambienti caldi si attuano per mezzo di effettori che facilitano la dispersione di calore, la cui attivazione si associa ad un'inibizione dell'attività degli organi termogenici. Fra questi il più importante è rappresentato dalla regolazione del flusso ematico cutaneo, ma questo può essere supportato da sistemi accessori, quali la polipnea e la sudorazione.

Come già detto, la variazione del flusso ematico alla cute permette di regolare la quantità di calore che viene dispersa, attraverso convezione, nell'ambiente. Nel caso di una T_a elevata, i vasi sanguigni dei distretti cutanei si dilatano, aumentando il flusso ematico cutaneo, viene trasferita una quantità maggiore di calore dal corpo all'ambiente e, conseguentemente, la T_c diminuisce.

Le ghiandole sudoripare hanno l'importante funzione termoregolatoria di disperdere calore attraverso la sudorazione. Queste ghiandole nell'uomo sono distribuite su tutta la superficie corporea con una distribuzione maggiore a livello delle mani e dei piedi.

La polipnea è un aumento non patologico della frequenza degli atti respiratori che si verifica normalmente durante uno sforzo fisico quando in seguito all'aumento dei processi metabolici è richiesta una maggiore quantità di ossigeno. Tale aumento si accompagna tipicamente a un aumento della profondità del respiro.

In condizioni di riposo, mediante l'aumento del ritmo respiratorio si evoca la termodispersione attraverso l'evaporazione dei liquidi contenuti sulle mucose polmonari e buccali. Durante questo tipo di controllo termoregolatorio il respiro si mantiene superficiale, consentendo solo lo scambio dell'aria dello spazio morto. La polipnea termica è presente solo in alcuni mammiferi ed è accentuata e intensa in quelli che per

particolari caratteristiche anatomiche hanno maggiore difficoltà a termoregolare in ambienti caldi (es. cani con il muso corto).

2.6 CONTROLLO NERVOSO CENTRALE DELLA TERMOREGOLAZIONE

2.6.1 Generalità sul Sistema Nervoso Autonomo

Il Sistema Nervoso Autonomo (SNA) è quella parte del Sistema Nervoso Centrale (SNC) deputata al controllo delle funzioni autonome o vegetative, ossia quelle funzioni che generalmente sono al di fuori del controllo volontario. Il SNA ha la funzione di regolare l'omeostasi dell'organismo ed è un sistema neuromotorio, non influenzabile dalla volontà, che opera con meccanismi appunto autonomi, relativi a riflessi periferici sottoposti al controllo centrale. Il SNA controlla soprattutto il movimento della muscolatura liscia, l'attività cardiaca e l'attività secretoria ghiandolare.

Langley (Langley J.N, 1921) divise il SNA nelle componenti simpatica e parasimpatica in base alle loro origini spinali e ai diversi effetti riscontrati mediante stimolazione nervosa e applicazione di agenti adrenergici e colinergici sui vari tessuti. Una terza branca del SNA, il sistema nervoso enterico, sfugge alla trattazione del presente elaborato.

Dal punto di vista funzionale, questi due sistemi prendono contatto con diversi organi nel corpo e contribuiscono bilanciandosi autonomamente al mantenimento dell'omeostasi dell'organismo così come è stato in passato definito da Cannon (Cannon WB, 1915). Le loro regolazioni sugli organi bersaglio avvengono grazie al rilascio di neurotrasmettitori che si legano a recettori specifici posti sugli stessi organi. I principali neurotrasmettitori rilasciati sono la noradrenalina per il simpatico e l'acetilcolina per il parasimpatico che si legano rispettivamente ai recettori adrenergici e colinergici.

Dal punto di vista anatomico i sistemi simpatico e parasimpatico si differenziano principalmente per la posizione dei gangli nervosi. Gli assoni dei motoneuroni o neuroni pregangliari simpatici (colinergici) lasciano il sistema nervoso centrale attraverso i nervi spinali toracici e lombari, mentre le fibre parasimpatiche pregangliari (colinergiche) lasciano il sistema nervoso centrale attraverso i nervi cranici (terzo, settimo, nono e decimo) e le radici spinali sacrali (terza e quarta).

La maggior parte delle fibre simpatiche pregangliari terminano nei gangli localizzati nelle catene paravertebrali, che si trovano su entrambi i lati della colonna vertebrale. Le rimanenti fibre pregangliari terminano nei gangli prevertebrali che si trovano davanti alle vertebre, di regola sulla superficie dell'aorta. Da questi gangli, le fibre simpatiche postgangliari giungono ai tessuti innervati.

Alcune fibre pregangliari parasimpatiche terminano in gangli parasimpatici localizzati all'esterno degli organi innervati: gangli ciliari, pterigopalatini, sottomandibolari, otici e diversi gangli pelvici. La maggior parte delle fibre pregangliari parasimpatiche si sfioccano sulle cellule gangliari distribuite in modo diffuso o a rete nelle pareti degli organi innervati.

Le fibre pregangliari parasimpatiche prendono contatto con i neuroni postgangliari colinergici, mentre quelle simpatiche prendono contatto con i neuroni postgangliari adrenergici.

Tutti gli organi sono innervati sia dal sistema nervoso simpatico sia dal sistema nervoso parasimpatico, che contribuiscono alla modulazioni delle attività degli organi stessi, ad eccezione delle ghiandole sudoripare, della muscolatura liscia dei vasi ematici e del tessuto adiposo bruno che invece sono innervati soltanto dal SNA simpatico.

2.6.2 Afferenze autonome simpatiche dirette ai vasi e agli organi termoregolatori

La muscolatura liscia a livello degli sfinteri precapillari e delle arteriole riceve afferenze dai neuroni adrenergici postgangliari. Questi attraverso il rilascio di noradrenalina, la quale si lega ai recettori adrenergici presenti sulle cellule muscolari dei vasi, determinano la contrazione muscolare e quindi la riduzione del flusso ematico; al contrario la riduzione del rilascio di noradrenalina determina l'apertura dei vasi e quindi l'aumento del flusso ematico. Quindi la vasocostrizione è un processo attivo, mentre la vasodilatazione è sempre un processo passivo che dipende solo dalla sospensione dell'attività vasocostrittoria e non da un'attività nervosa inibitoria sulla muscolatura del vaso. Casi particolari sono rappresentati dalla dilatazione locale di alcuni distretti vascolari in seguito alla liberazione di monossido d'azoto (NO), o da specifiche fibre vasodilatorie, identificate per alcuni particolari distretti, come la cute del palmo della mano nell'uomo.

Il soma dei neuroni postgangliari è accolto all'interno dei gangli della catena simpatica paravertebrale e riceve afferenze dai neuroni pregangliari colinergici. Il neurosoma di questi ultimi, detti secondo la nomenclatura attuale motoneuroni autonomi simpatici, è invece posizionato a livello della colonna intermedio laterale (IML) della sostanza grigia del midollo spinale.

Il SNA simpatico invia afferenze agli organi termoregolatori come il BAT, la cui attivazione è garantita da una diretta connessione tra le sue cellule e una serie di neuroni pregangliari simpatici posizionati a vari livelli del midollo spinale: da lì il rilascio di noradrenalina ed il legame di questa a livello dei recettori β_3 determina un'attivazione di meccanismi a secondo messaggero che in ultima analisi innescano sia la produzione

di calore che la sintesi di proteine UCP1 ed allo stesso tempo determinano il trofismo per questo tessuto. L'attivazione è altresì garantita da meccanismi endocrini come il rilascio di T3 e T4 dalla tiroide.

2.6.3 Premotoneuroni simpatici

I neuroni che sinaptano direttamente con i neuroni motori simpatici localizzati nella IML, sono detti premotoneuroni. La principale caratteristica di questi neuroni è quella di essere il punto di convoglio di tutte le informazioni inibitorie ed eccitatorie che provengono da diversi nuclei cerebrali o da recettori periferici e che quindi si traducono in una attivazione od inibizione dei processi che questi neuroni controllano (es. vasomozione). Questi neuroni possono essere di tipo inibitorio o eccitatorio in funzione del neurotrasmettitore che viene prodotto e rilasciato dalle loro sinapsi.

Studi anatomici condotti mediante l'utilizzo di marcatori virali retrogradi (*pseudo-rabies virus*) hanno portato all'identificazione di nuclei ed aree nervose in cui sono accolti aggregati di premotoneuroni che assolvono alla medesima funzione. Questa tecnica consiste nell'iniettare in tessuto o in una area nervosa un virus retrogrado, cioè in grado di risalire gli assoni e trasferirsi transinapticamente da un neurone all'altro, e poi determinare il percorso che esso ha compiuto risalendo il SNC e permettendo infine la visualizzazione delle aree nervose coinvolte nel controllo delle aree poste sotto esame.

Questo approccio sperimentale ha permesso la localizzazione di diverse aree cerebrali contenenti premotoneuroni, coinvolti nella termoregolazione e nella vasomozione cutanea, le quali sono maggiormente localizzate a livello del tronco encefalico (bulbo e ponte) e nelle aree ipotalamiche.

Per quanto concerne il controllo del sistema cardiocircolatorio e quindi di conseguenza la vasomozione cutanea sono state localizzate nel ratto cinque specifiche aree contenenti premotoneuroni: il bulbo rostrale ventromediale (RVMM), il bulbo rostrale ventrolaterale (RVLM), i nuclei del raphe caudale, i neuroni A5 noradrenergici del ponte e i nuclei paraventricolari ipotalamici (PVN).

2.6.4 Bulbo rostrale ventromediale

Diverse evidenze sperimentali hanno dimostrato che il RVMM costituisce il nodo di afferenza di tutti i segnali termoregolatori. In particolare, studi anatomici condotti mediante l'iniezione di pseudorabies virus in organi specificatamente termoregolatori come: BAT (Cano et al., 2003), vasi ematici degli scambiatori termici (coda ratto) (Blessing and Nalivaiko, 2001, Toth et al., 2006), cuore (Standish et al., 1995, Ter Horst et al., 1996) e muscolo (Kerman et al., 2006) sono tutti risultati nella marcatura a livello del RVMM.

Si intende per RVMM un area cerebrale sita sopra il tratto piramidale che comprende: il *raphe obscurus*, il *raphe magno*, il *raphe pallidus* ed il nucleo olivare inferiore. In quest'area sono quindi contenuti i premotoneuroni autonomici simpatici diretti ai neuroni pregangliari che controllano diversi effettori termoregolatori.

Le principali funzioni svolte da questi neuroni sono nel controllo dell'attivazione del BAT, nella vasomozione cutanea, nella termogenesi da brivido attraverso l'attivazione delle fibre motorie alfa dirette ai muscoli e nel controllo della frequenza cardiaca. Questi neuroni sono ricchi di recettori per il glutammato, il GABA e la serotonina. Tuttavia sono presenti numerosi altri recettori tra i quali recettori per l'ipocretina, per l'istamina e per l' α MSH. Inoltre si è riscontrata la presenza di recettori

EP3 localizzati sulle cellule serotoninergiche. Questi ultimi sono particolarmente abbondanti nella regione preottica ipotalamica e legano in maniera specifica il mediatore infiammatorio prostaglandina E2 (PGE2). Il legame di questo mediatore a livello ipotalamico determina il rialzo termico nella risposta di tipo febbrile come evidenziato da incrementi di temperatura in seguito ad iniezioni di PGE2 nella regione preottica (Stitt, 1973, Williams et al., 1977). Ad oggi non si conosce il significato funzionale dei recettori EP3 a livello del RVMM. L'iniezione di PGE2 in questo sito non ha determinato nessuna variazione apprezzabile delle variabili fisiologiche misurate: pressione arteriosa, frequenza cardiaca, temperatura corporea e vasomotone cutanea (Tanaka and McAllen, 2005). Si ipotizza che questi recettori svolgano funzioni legate alla sensazione dolorifica durante gli stati febbrili ed infiammatori.

Svariati studi anatomici volti alla caratterizzazione dei neuroni del RVMM hanno riscontrato la presenza in essi del marcatore specifico dei neuroni glutamatergici: VGLUT3. La presenza di questo marcatore indica che questi neuroni sono di tipo glutamatergico ed inoltre lasciano supporre che le risposte termoregatorie da essi mediate e dirette alla IML siano di tipo eccitatorio (McAllen et al., 1982, McAllen, 1986, Morrison, 1999, Nakamura et al., 2005). Tuttavia studi effettuati da Stornetta (Stornetta et al., 2005) hanno mostrato una maggiore complessità anatomica in quest'area. Infatti è stato dimostrato che i premotoneuroni del RVMM diretti alla IML co-esprimono glutammato, GABA e serotonina. Questo studio inoltre, per la prima volta mostra un'afferenza dal RVMM alla IML di tipo inibitorio.

I neuroni del RVMM contribuiscono in modo determinante alla regolazione della temperatura corporea. Durante l'esposizione ad ambienti freddi la loro attività eccitatoria diretta alla IML determina l'attivazione dei processi termogenetici svolti principalmente dal BAT (Morrison, 2003) e probabilmente dal brivido muscolare

(Tanaka et al., 2006, Brown et al., 2008). Inoltre, permettono nelle medesime condizioni ambientali la vasocostrizione dei letti vascolari cutanei (Smith et al., 1998, Blessing et al., 1999, Blessing and Nalivaiko, 2001, Tanaka et al., 2002, Nakamura et al., 2004, Ootsuka and Blessing, 2005, Toth et al., 2006) al fine di ridurre la dispersione di calore ed un incremento della frequenza cardiaca al fine di garantire sia una maggiore richiesta di ossigeno a livello degli organi termogenetici che un maggiore trasporto di calore nei vari distretti anatomici. Al contrario l'esposizione ad ambienti caldi causa una riduzione dell'attività di questi neuroni che determina la sospensione delle attività termogenetiche, una riduzione della frequenza cardiaca (Nakamura and Morrison, 2007) e la vasodilatazione dei letti vascolari cutanei (Ootsuka et al., 2004, Morrison and Nakamura, 2010).

L'inibizione dell'attività del RVMM ottenuta attraverso la somministrazione locale ripetuta dell'agonista GABA_A muscimolo induce nel ratto libero di muoversi esposto a bassa temperatura ambientale un'ipotermia assai profonda (T_c, 22°C) che si accompagna a una marcata bradicardia e a una marcata riduzione dell'attività elettrica corticale (Cerri et al., 2013).

3. REGOLAZIONE DELLA TEMPERATURA CORPOREA E DELLA FUNZIONE CARDIOVASCOLARE DURANTE IL SONNO

Come precedentemente descritto, studi condotti sia sugli animali, sia sull'Uomo hanno messo in evidenza una stretta relazione tra sonno e termoregolazione. Questi studi hanno fornito prove sull'esistenza di un rapporto tra le aree centrali sottese al controllo termoregulatorio e quelle coinvolte nella regolazione del ciclo veglia-sonno.

La termoregolazione omeostatica è attiva sia nella veglia, sia nel sonno NREM, anche se ci sono delle differenze relative alla soglia e all'entità delle risposte effettrici.

La termoregolazione comportamentale durante il sonno è limitata perché la ricerca di un ambiente confortevole dal punto di vista termico non è più possibile dopo l'inizio del sonno. Durante il sonno NREM è però possibile, in risposta ad un aumento o ad un calo della temperatura, assumere specifiche posture al fine di mantenere equilibrato il bilancio tra termodispersione e termogenesi. Durante il sonno REM, invece, l'atonia muscolare sopprime le risposte termoregolatorie posturali.

La relazione tra sonno e termoregolazione è più peculiare durante la fase REM. È in questa fase infatti che l'animale perde il controllo omeostatico della temperatura. È stato evidenziato che durante il sonno REM nell'animale scompaiono alcuni comportamenti termoregolatori che invece sono attivi durante la veglia e il sonno NREM (Parmeggiani, 2003).

L'esposizione a basse temperature induce il brivido durante il sonno NREM, mentre nella transizione dal NREM al sonno REM il brivido scompare e la sua assenza perdura per tutto l'episodio di sonno REM (Parmeggiani e Rabini, 1967). Anche l'attivazione del BAT, utile come difesa dal freddo, è inefficace durante il sonno REM rispetto al sonno NREM (Calasso et al., 1993). La piloerezione nel gatto è presente durante il sonno NREM e scompare durante il sonno REM (Hendricks, 1982).

L'esposizione a T_a elevate induce polipnea durante il sonno NREM, mentre questa è soppressa già nella transizione dal sonno NREM al sonno REM e tale soppressione perdura per tutto l'episodio di sonno REM (Parmeggiani e Rabini, 1967, Parmeggiani e Rabini, 1970). La sudorazione si osserva durante il sonno NREM a T_a neutra e alta, mentre risulta prima soppressa (Dewasmes et al., 1997) e poi depressa

durante il sonno REM (Ogawa et al., 1967; Shapiro et al. 1974; Sagot et al., 1987; Dewasmes et al. 1997).

Anche nell'uomo si osserva una notevole inibizione delle risposte termoregolatorie durante la fase REM. In individui esposti a Ta neutra o elevata si nota una diminuzione della sudorazione durante il sonno REM. In particolare, la perdita di acqua per evaporazione cala bruscamente all'inizio del sonno REM, raggiunge il livello minimo durante il sonno REM e risale rapidamente alla fine dell'episodio. Questo dato è indicativo della soppressione dei meccanismi effettori responsabili della perdita di calore.

La vasomozione in numerose specie di mammiferi influenza la perdita di calore. Sia durante la veglia, sia durante il sonno NREM gli scambiatori di calore sono regolati dal sistema nervoso simpatico, la cui attività cambia in relazione alla Ta e alla temperatura della regione preottica dell'ipotalamo. È stato evidenziato, al contrario, durante la fase REM un comportamento anomalo della vasomozione cutanea. Si osserva infatti vasocostrizione cutanea in animali esposti al caldo e vasodilatazione cutanea in quelli esposti al freddo, ovvero comportamenti vasomotori che vanno contro alla normale logica di termodispersione e termoconservazione. Sembra che l'area preottica ipotalamica sia responsabile di questa alterazione.

Studi anatomici e neurofisiologici hanno evidenziato che l'area preottica dell'ipotalamo è il principale integratore delle informazioni ipniche e termoregolatorie. È quest'area infatti che integra le informazioni sugli stati comportamentali, sulla Tc e sulla Ta ed influenza di conseguenza gli stati comportamentali e la Tc. In questa area è presente una popolazione di neuroni sensibili alla temperatura. È stato dimostrato che questi neuroni sono attivi durante l'esposizione dell'animale ad una temperatura termoneutrale e che la loro scarica aumenta in seguito ad un riscaldamento locale

(Nakayama et al., 1963). Tali neuroni possono integrare tutte le informazioni termiche che provengono dalla periferia con quelle registrate in loco e conseguentemente generare risposte termoregatorie adeguate. È proprio da qui che ha origine la cosiddetta via termoeffettrice. Questi neuroni però perdono questa loro capacità durante il sonno REM, infatti da studi effettuati sul gatto è emerso che il riscaldamento ed il raffreddamento di quest'area durante la fase REM non comportano alcuna risposta termoregatoria contrariamente a quanto avviene durante il sonno NREM e la veglia (Parmeggiani e Franzini, 1971; Glotzbach e Haller, 1976).

I meccanismi termoregolatori non sono quindi attivi durante il sonno REM. I processi del sonno REM in pratica annullano l'attività specifica dei neuroni dell'area preottica che è alla base dell'omeostasi termica. Tuttavia, questo non mette l'organismo in una condizione di pericolo poiché la durata degli episodi di sonno REM è breve in relazione all'inerzia termica del corpo e i meccanismi di risveglio sono sempre pronti ad opporsi ad un'eccessiva modifica della temperatura del nucleo corporeo, ripristinando il controllo termoregulatorio da parte dell'area preottica.

Durante il ciclo NREM-REM si assiste, anche, a un profondo cambiamento delle regolazioni fisiologiche delle funzioni cardiovascolari (Parmeggiani 2005). Il sonno NREM è caratterizzato da una sottoregolazione dell'attività cardiovascolare di variabile intensità dipendente dalla specie e dal livello della veglia precedente. Nel gatto si assiste ad una diminuzione della pressione arteriosa (Mancia G. et al., 1980) che manca nel coniglio (Lenzi P. et al., 1987) e che è meno consistente nel ratto (Meunier JM et al., 1988). Nei gatti, la frequenza cardiaca è moderatamente diminuita (Baust W. et al., 1969; Mancia G. et al., 1980), mentre il volume sistolico rimane praticamente invariato (Mancia G. et al., 1980). Si assiste, inoltre, ad una significativa diminuzione nella frequenza cardiaca nei ratti (Lacombe J et al., 1988; Meunier JM et al., 1988), ma tale

diminuzione non è statisticamente significativa nei conigli (Lenzi P. et al., 1987). Negli esseri umani si osserva una tonica diminuzione della pressione arteriosa (Snyder F et al., 1964), tuttavia essa varia di intensità in differenti individui (Mancia G. et al., 1993). La sensibilità del riflesso barocettivo è aumentata negli esseri umani (Conway J et al., 1983). Nel gatto si osserva un lieve aumento della conduttanza vascolare della cute (Mancia G et al., 1980), nel letto vascolare mesenterico, in quello iliaco e in quello renale, inoltre si verifica un aumento della conduttanza nel letto vascolare del coniglio (Franzini C et al., 1982) e degli esseri umani (Sindrup JH et al., 1992; Noll G. et al., 1994). Nel complesso, durante il sonno NREM i cambiamenti nelle variabili cardiovascolari si associano a quelli termoregolatori in una condizione motoria e posturale quiescente (Parmeggiani PL., et al., 2005).

Differenti fenomeni caratterizzano il sonno REM sia negli animali, sia negli esseri umani. La pressione arteriosa subisce un marcato calo nei gatti come risultato di una pronunciata bradicardia associata ad un invariato volume sistolico ed ad un aumento nella conduttanza vascolare totale: l'aumento della conduttanza vascolare nel letto cutaneo, in quello mesenterico e renale prevale sulla diminuzione della conduttanza vascolare nell'arto posteriore (Mancia G. et al., 1980; Baccelli G. et al., 1974). Tuttavia in accordo con altri studi, nei gatti (Iwamura Y. et al., 1969) non è stata riscontrata una caduta della pressione arteriosa, ed inoltre la bradicardia e l'ipotensione osservate durante il sonno REM potrebbero essere un effetto di lunga durata derivante dall'intervento a cui sono stati sottoposti gli animali usati durante l'esperimento (Sei H. et al., 1989; Sei H. et al., 1994). Di conseguenza, la frequenza cardiaca e la pressione arteriosa sono più alte nel sonno REM che nel sonno NREM. Questa condizione cardiovascolare appare dipendere da influenze del prosencefalo (Kanamori N. et al., 1995). Nei conigli (Lenzi P. et al., 1987), nei ratti (Junqueira LF. et al., 1976) e negli

esseri umani la pressione arteriosa aumenta nel passaggio dal sonno NREM al sonno REM, ma questo aumento non è sempre relazionato a cambiamenti consistenti nelle variabili primarie, (per esempio frequenza cardiaca e conduttanza vascolare) (Coccagna G. et al., 1971). Nel coniglio, le conduttanze nel letto vascolare renale e del grasso sembrano essere diminuite durante il sonno REM (Lenzi P. et al., 1987). La scarsa correlazione tra le variabili regionali e sistemiche mostra che l'integrazione centrale delle funzioni cardiovascolari è alterata durante il sonno REM. Infatti, la distribuzione regionale del flusso sanguigno è marcatamente modificata se paragonata a quella durante il sonno NREM (Cianci T. et al., 1991). La variabilità della frequenza cardiaca e della pressione arteriosa è un'importante caratteristica del sonno REM dei gatti (Gassel M. et al., 1964; Guazzi M. et al., 1965), dei ratti (Junqueira LF. et al., 1976), dei conigli (Dufour R. et al., 1977) e degli esseri umani (Coccagna G. et al., 1971) e può associarsi a movimenti rapidi oculari, twitches mioclonici, e probabilmente molto più spesso ad irregolarità respiratorie. Tuttavia questa variabilità non è soltanto il risultato diretto di cambiamenti centrali nella regolazione del rilascio autonomico (Franzini C. et al., 1990; Parmeggiani PL. et al., 1994); questi cambiamenti attivano indirettamente dei feedback influenzando il controllo periferico delle variabili cardiovascolari (Baust W. et al., 1969). Pertanto l'interazione tra la variabilità del controllo centrale viscerale durante il sonno REM e gli effetti centrali dei riflessi attivati sono i fattori principali nella generazione dell'instabilità della regolazione cardiovascolare del sonno REM (Parmeggiani et al., 2005). Nei gatti, la pressione arteriosa durante il sonno REM è stabilizzata dai riflessi del seno aortico (Iwamura Y. et al., 1969; Guazzi M. et al., 1965). Infatti dopo denervazione del seno aortico, la pressione arteriosa è moderatamente diminuita durante la veglia rispetto a quanto osservato in animali normali, durante il sonno NREM, ma diminuisce bruscamente durante il sonno REM. Questa diminuzione

negli episodi del sonno REM potrebbe produrre ischemia cerebrale come rivelato dagli appiattimenti dell'elettroencefalogramma e dalle convulsioni motorie (Guazzi M. et al., 1965). La marcata caduta della pressione arteriosa dopo denervazione del seno aortico dipende dalla maggiore vasodilatazione nel letto vascolare splanchnico (Mancia G. et al., 1980; Baccelli G. et al., 1978). Rimozioni selettive delle afferenze barocettive o chemiorecettoriali mostrano che nei gatti l'ipotensione arteriosa durante il sonno REM è stabilizzata principalmente dal riflesso chemocettivo in quanto, in questa specie, il riflesso barocettivo, è depresso (Mancia G. et al., 1980; Knuepfer MM. et al. 1986)

Nei ratti i riflessi barocettivi sono più efficaci di quelli del gatto nello stabilizzare l'ipotensione del sonno REM. Nei ratti la pressione arteriosa aumenta durante il sonno REM, mentre dopo essere stati sottoposti a denervazione barorecettoriale, si osserva ipotensione, come viene riscontrato anche nei gatti (Junqueira LF Jr. et al., 1976; Meunier JM. et al., 1988). Tuttavia è difficile stabilire quale sia il ruolo dei barocettori nel sonno REM a causa degli effetti, di lunga durata, causati dall'intervento a cui gli animali degli esperimenti sono sottoposti (Sei H. et al 1989; Sei H. et al 1994). I risultati degli studi barocettivi negli esseri umani suggeriscono che bisogna essere cauti nell'interpretazione di questi dati in quanto la sensibilità del riflesso potrebbe o aumentare (Jones Jv. et al., 1982) o diminuire (Conway J. et al., 1983), nel sonno REM. Tuttavia quando i risultati sono osservati nel loro insieme, sembra probabile che la circolazione in differenti specie, sia condizionata da influenze centrali simili durante il sonno REM. Bisogna tener presente che l'eventuale pattern di cambiamenti delle variabili cardiovascolari potrebbe dipendere anche dalle differenze specie specifiche dei sistemi di regolazione (Gilmore JP. et al., 1984; Cowley AW Jr. et al 1989). Tenendo in considerazione il controllo dei centri integrativi cerebrali sulla regolazione cardiovascolare (Behbehani MM. et al., 1996) del

tronco encefalico, nei gatti la vasomozione termoregolatoria indotta dalla stimolazione termica diretta della regione preottica ipotalamica durante il sonno NREM è soppressa durante il sonno REM in accordo alla diminuzione della risposta dei neuroni termosensibili della zona preottica ipotalamica (Alam MN et al., 1995). Inoltre, è stato osservato che nei gatti durante il sonno REM si assiste ad una depressione del controllo telencefalico (amigdala, corteccia frontale orbitale) sull'attività cardiovascolare (Frysinger RC. et al., 1984).

Alla luce dei dati sopracitati si può concludere che, durante il sonno NREM si osserva un aumento relativo dell'attività parasimpatica con riduzione di quella simpatica mentre, durante il sonno REM compaiono in modo caratteristico aumenti improvvisi sia dell'attività parasimpatica, sia di quella simpatica (Parmeggiani e Morrison, 1990). A livello del sistema cardiocircolatorio nella fase NREM si osservano ipotensione, bradicardia e riduzione delle resistenze periferiche (Junquera e Krieger, 1976), mentre nella fase REM si ha un aumento della pressione arteriosa, un'alterazione della sensibilità barocettiva e la comparsa di bruschi picchi pressori (Coccagna et al., 1971).

4. IPOTALAMO LATERALE

4.1 ANATOMIA FUNZIONALE DELL'IPOTALAMO LATERALE

L'ipotalamo è una parte altamente integrativa del diencefalo che risulta essere essenziale per la riproduzione, per l'omeostasi e per la sopravvivenza. Andando dalla parte rostrale alla caudale, l'ipotalamo è costituito dall'area preottica (POA), dall'ipotalamo anteriore, dall'ipotalamo posteriore e dalla regione mammillare. L'ipotalamo può comunque essere considerato come composto dalle zone periventricolare, mediale e laterale e tutte queste regioni hanno differenti funzioni.

Thompson e Swanson (2003) più recentemente hanno proposto una divisione funzionale e neuroanatomica molto più dettagliata, dal mediale al laterale: 1) l'area motoria neuroendocrina, la quale è adiacente al terzo ventricolo e contiene i neuroni motori endocrini che si proiettano alla ghiandola pituitaria posteriore e all'eminenza mediana; 2) la regione periventricolare che contiene la rete di sincronizzazione circadiana e la rete che genera i patterns visceromotori; 3) la porzione di controllo comportamentale che contiene molti nuclei coinvolti nel controllo di precisi comportamenti ed è maggiormente localizzata nella zona mediale; 4) la zona laterale (o area ipotalamica laterale, LH) che rappresenta il punto di incrocio delle strutture del prosencefalo, dell'area mediale e periventricolare dell'ipotalamo, del tronco cerebrale e del midollo spinale.

L'ipotalamo laterale è stato inizialmente descritto come centro dell'alimentazione e della veglia in quanto modelli animali con lesioni dell'LH mostrano ipofagia e diminuzione della veglia che spesso conducono alla morte, ma recenti studi hanno chiaramente rivelato che l'LH contribuisce a regolare altri aspetti fisiologici come il controllo del sistema nervoso autonomo, dello stress e del sistema della ricompensa.

La caratterizzazione iniziale dell'ipotalamo laterale come centro per l'assunzione di cibo, suggerì che esso doveva interagire con regioni del cervello che coordinano questo comportamento. Questa linea di pensiero indusse un intenso interesse nel mappare la connettività neuronale dell'LH per meglio comprendere il suo ruolo funzionale nella neurofisiologia e nel comportamento. Immediatamente si evinse che l'LH proiettando attraverso connessioni polisinaptiche al cervello, regola anche bersagli al di fuori di esso (Leininger M. et al., 2011).

L'area ipotalamica laterale, quindi è un'ampia ed eterogenea zona con diversi gruppi nucleari distinti e, grazie alle sue numerose connessioni, riceve una vasta gamma di informazioni interocettive ed esterocettive e modula funzioni cognitive, motorie scheletriche, del sistema nervoso autonomo e del sistema endocrino, del sistema cardiovascolare e del tessuto adiposo bruno (Kerman IA et al., 2006) (Fig. 1). Questa regolazione probabilmente coordina la motivazione inviando segnali adeguati alla periferia, per esempio ai muscoli per cercare il cibo, al cuore e ai vasi per indurre l'aumento della frequenza cardiaca e della pressione del sangue per supportare il sistema locomotore, e al tessuto adiposo bruno per la spesa energetica.

Generalmente, l'area ipotalamica laterale può essere divisa in anteriore, tuberale (all'incirca al livello dell'ipotalamo ventromediale) e nelle porzioni posteriori in base alle sue connettività efferenti, come descritto per la prima volta da Saper (Saper CB et al., 1979). Un'altra utile guida anatomica è il pattern di distribuzione delle due popolazioni di neuroni che esprimono ipocretina o l'ormone che concentra la melanina (MCH) (Swanson IW et al., 2005).

Nell'ipotalamo caudale e mediale dei roditori, L'LH giace principalmente sopra e lateralmente al fornice. Infatti le zone dell'ipotalamo laterale sono spesso suddivise in aree, sopra e intorno al fornice (zona perifornicale) o ventrale al fornice (la regione subfornicale), e tali regioni differiscono nella loro connettività (Hahn JD et al., 2010).

Soprattutto due fasci di fibre attraversano l'area ipotalamica laterale: il fascio prosencefalico mediale che si estende dal tronco encefalico al bulbo olfattivo, integrando processi neuronali da diverse aree del cervello, tra cui i neuroni ipotalamici laterali (Nieuwenhuys R. et al., 1982), e il fornice, collegando il complesso dell'ippocampo con i nuclei mammillari nell'ipotalamo posteriore ventrale. Questo rende difficoltosa l'interpretazione degli studi di stimolazione elettrica e di lesione,

dovendo considerare il coinvolgimento di fibre aspecifiche di passaggio (Nieuwenhuys R et al., 1982).

Le afferenze all'area ipotalamica laterale sono state classicamente studiate con tecniche che utilizzano traccianti retrogradi. Data la difficoltà nell'interpretare i risultati ottenuti con l'uso di tali traccianti, che potrebbero essere captati non solo dai terminali degli assoni, ma anche da fibre di passaggio, bisognerebbe verificare i potenziali siti afferenti con traccianti anterogradi. Sulla base di tale verifica, è stato dimostrato che alcune delle afferenze all'area ipotalamica laterale hanno origine da varie strutture cortico-limbiche come quella prefrontale/orbitofrontale, l'insulare, la corteccia olfattiva, l'amigdala, la formazione dell'ippocampo, la conchiglia del nucleo accumbens e le strutture del tronco cerebrale, tra cui la maggior parte dei gruppi di cellule aminergiche come il nucleo del tratto solitario (Simerly et al., 1995).

Le afferenze dalla parte mediale dell'ipotalamo, anche se generalmente sparse, sono funzionalmente molto significative, come ad esempio, le proiezioni dal nucleo arcuato dei neuroni che esprimono pro-opiomelanocortina (POMC) ed il trascritto regolato dalla cocaina ed dall'anfetamina (CART), dai neuroni che esprimono il neuropeptide Y (NPY) e il peptide correlato alla proteina Agouti (AgRP) (Elias CF et al., 1998) (Fig. 2) .

L'area perifornicale nell'ipotalamo laterale riceve notevoli input NPY-ergici dal nucleo arcuato, ed un'iniezione nell'area perifornicale di NPY provoca un forte aumento dell'appetito (Stanley BG et al., 1993). Inoltre, data la sua dimensione e complessità strutturale, vi è una notevole connettività all'interno dell'ipotalamo laterale stesso, in particolare ci sono proiezioni dalle porzioni anteriori a quelle posteriori (Sano H et al., 2007).

Recentemente, Sakurai e colleghi hanno usato un metodo transgenico per mappare le popolazioni neuronali che hanno connessioni sinaptiche coi neuroni ipocretinergici, confermando la maggior parte dei vecchi risultati ottenuti con tecniche di marcatura classiche (Sakurai T et al., 2005) (Fig. 1). In un altro recente studio è stato utilizzato il trasporto retrogrado di virus neurotrofici per mappare circuiti compresi nell'area ipotalamica laterale. Tali studi hanno rivelato proiezioni dal nucleo arcuato, in particolare dalla porzione laterale contenente i neuroni POMC, alla corteccia insulare e cingolata anteriore attraverso relè sinaptici nell'area ipotalamica laterale (anche su neuroni ipocretinergici ed MCH) e nella linea mediana dei nuclei talamici. In modo simile, le proiezioni che vanno dall'ipotalamo laterale alla conchiglia del nucleo accumbens originano sia dai neuroni del POMC che dell' NPY/AgRP (Kampe J. et al., 2009)

L'ipotalamo laterale ha vaste proiezioni efferenti a tutto il mantello corticale, compresa la formazione dell'ippocampo, l'amigdala, i gangli basali e il talamo, il mesencefalo e il ponte, il midollo spinale e il tronco encefalico, e a molti altri nuclei ipotalamici (Ricardo JA et al., 1978; Ter Horst GJ et al., 1987; Berk ML et al., 2009) (Figg. 1 e 2). Queste proiezioni sono state rilevate utilizzando iniezioni di traccianti retrogradi, che hanno marcato i pericari nell'ipotalamo laterale. Recentemente, sulla base di studi di immunoistochimica, molte di tali proiezioni sono state confermate utilizzando anticorpi per i neurotrasmettitori peptidici che sono prodotti quasi esclusivamente nell'ipotalamo laterale come l'ipocretina e l'MCH (Saper CB et al., 2000).

All'interno dell'ipotalamo laterale ci sono proiezioni efferenti alla maggior parte dei nuclei della zona ipotalamica mediale come l'arcuato, il paraventricolare, il dorsomediale, il ventromediale, e i nuclei ipotalamici anteriori (Simerly RB, 1995). In

particolare, è stato dimostrato che, i neuroni ipocretinergici proiettano ai nuclei dell'arcuato e paraventricolari (Lecea L et al., 1998).

Mogenson è stato il primo a riconoscere che il nucleo accumbens, con le sue proiezioni efferenti all'ipotalamo laterale, può fornire un'interfaccia tra la motivazione e l'azione comportamentale (Mogenson GJ. et al., 1980), e la sua idea di base è stata ulteriormente sviluppata più recentemente (Groenewegen HJ. et al., 1996; Zahm DS. et al., 2000). In maniera specifica, Zahm ha presentato una prospettiva neuroanatomica integrativa e ha proposto un quadro concettuale convincente coinvolgendo questi circuiti nelle risposte adattative generali (Zahm DS. et al., 2000). Particolarmente rilevante è la dimostrazione dell'esistenza di significative proiezioni dal nucleo accumbens all'ipotalamo. Come mostrato con vari metodi che utilizzano traccianti, queste proiezioni provengono principalmente dalla conchiglia dell'accumbens e terminano prevalentemente nell'ipotalamo laterale e nell'area perifornicale (Sano H. et al., 2007; Otake K. et al., 2000). Oltre che con proiezioni dirette, il nucleo accumbens può influenzare la funzione ipotalamica attraverso le sue estese proiezioni al pallido ventrale, situato ventralmente al nucleus accumbens (Groenewegen HG. et al., 1996), e tramite l'area tegmentale peduncolopontina (Inglis WL. et al., 1995). Il pallido ventrale proietta direttamente all'area ipotalamica laterale (Groenewegen HG. et al., 1993; Zahm DS. et al., 1996), e questa proiezione potrebbe essere coinvolta nella regolazione dell'assunzione di cibo indotta dall'accumbens (Stratford TR. et al., 1999).

4.2 PRINCIPALI POPOLAZIONI NEURONALI DELL'IPOTALAMO LATERALE

L'ipotalamo laterale è composto da una complessa rete di differenti popolazioni di neuroni coinvolti in svariate funzioni fisiologiche. Alcuni membri di queste

popolazioni neuronali, vengono etichettati come oressizzanti, ad esempio i neuroni galaninerfici, ipocretinerfici ed MCH, mentre altre vengono definite anoressizzanti, come i neuroni che esprimono neurotensina e CART.

I neuroni che esprimono neurotensina non sono esclusivamente situati nell'ipotalamo laterale, ma sono molto diffusi in quest'area (Beitz AJ et al., 1982). La somministrazione centrale di neurotensina inibisce l'assunzione di cibo tramite la manipolazione del sistema mesolimbico dopaminergico (DA) (Hawkins MF et al., 1986; Cador M et al., 1986). Inoltre, l'azione anoressizzante della leptina induce l'espressione della neurotensina (Sahu A., 1998) e suggerisce il coinvolgimento di recettori che esprimono la leptina sui neuroni neurotensinerfici dell'ipotalamo laterale (Leininger GM. et al., 2008).

I neuroni che esprimono galanina sono stati descritti come diffusi in tutto il cervello, incluso l'ipotalamo laterale. Quando iniettata nel nucleo paraventricolare, la galanina stimola il consumo di cibo, particolarmente di dieta grassa ad alto contenuto calorico e di alcol, inoltre il consumo di una dieta di questo tipo stimola l'espressione del gene della galanina con un sistema a feedback positivo (Barson JR et al., 2010). Mentre la somministrazione di leptina e un'alimentazione costituita da una dieta grassa, non modificano l'espressione della galanina (Barson JR et al., 2010), i topi con una deficienza di galanina mostrano un'aumentata sensibilità alla leptina (Sahu A. et al., 1998).

Molti studi hanno dimostrato che la galanina centrale modula anche il sistema mesolimbico dopaminergico (DA), probabilmente tramite l'azione della galanina nell'area ventrale tegmentale (VAT) (Ericson E et al., 1999) coinvolgendo le proiezioni galaninerfiche dal nucleo paraventricolare dell'ipotalamo o dal locus coeruleus. Tuttavia data l'intensa e specifica localizzazione della galanina e della neurotensina

nell'area perifornicale dell'ipotalamo laterale, i neuroni galaninergici in quest'area potrebbero contribuire plausibilmente alla modulazione del sistema mesolimbico DA (Robinson JK et al., 2008). Inoltre è stato valutato il coinvolgimento della galanina nei comportamenti legati allo stress e alla dipendenza da farmaco (Hawes JJ et al., 2008) che si pensa coinvolgano la trasduzione dopaminergica (Picciotto et al., 2010).

I neuroni che esprimono CART, sono sparsi nell'ipotalamo laterale e in altre zone del cervello. Iniezioni intracerebroventricolari di CART inibiscono l'assunzione di cibo. Mentre la leptina induce l'espressione dell'mRNA di CART nel nucleo arcuato e, in maniera più moderata, nel nucleo dorsomediale e nella parte mediale dell'ipotalamo laterale. Il digiuno inibisce la suddetta espressione (Kristensen P. et al., 1998).

4.2.1 Neuroni ipocretinergici

Nel 1998, due gruppi, indipendentemente, scoprirono gli stessi neuropeptidi usando differenti strategie. Sakurai et al. (1998) usarono la farmacologia inversa per identificare ligandi di recettori orfani accoppiati a proteine G (GPCRs) strettamente correlati. Dato che le iniezioni dei due ligandi inducevano l'assunzione di cibo, li chiamarono ipocretine, dal greco "orekteos" che significa inducente l'appetito (Sakurai et al., 1998).

Allo stesso tempo, de Lecea et al. (1998) isolarono dei cDNAs selettivamente espressi all'interno dell'LH. Due peptidi facenti parte dei cDNAs mostrarono omologie sostanziali nella sequenza aminoacidica con l'ormone peptidico dell'intestino secretina. Quindi chiamarono questi due peptidi "ipocretine" e suggerirono che funzionassero attraverso il sistema nervoso centrale come neurotrasmettitori. Studi di clonaggio molecolare hanno dimostrato che questi peptidi derivano da una molecola precursore comune, la PRE-PRO-Ipocretina che tramite proteolisi viene scissa per produrre

l'ipocretina A e l'ipocretina B (Sakurai et al., 1998; Willie et al., 2001). Le ipocretine costituiscono una nuova famiglia di peptidi, che non mostra alcuna omologia con nessun altro peptide precedentemente descritto. Analisi strutturali del peptide purificato hanno mostrato che l'ipocretina A è un peptide composto da 33 amminoacidi, con un residuo N-terminale di piroglutamile, 2 legami con ponti disolfuro formati da quattro residui Cys, e un'amidazione C-terminale. Questa struttura è completamente conservata in diverse specie di mammiferi (uomo, ratto, topo, cane, maiale, mucca, pecora). L'ipocretina B è un peptide lineare di 28 amminoacidi con un'amidazione C-terminale. La parte C-terminale dell'ipocretina B è molto simile a quella dell'ipocretina A, mentre la parte N-terminale è molto variabile. Le attività delle ipocretine sono mediate dai due GPCRs, ovvero dai recettori ipocretina1-R e ipocretina2-R (conosciuti anche come HCRT1-R e HCRT2-R). Il recettore ipocretina1-R ha maggiore affinità per l'ipocretina A rispetto all'ipocretina B. Al contrario, il recettore ipocretina 2-R ha affinità simile per entrambi i ligandi.

Nel loro iniziale report Sakurai et al. (1998) descrissero la struttura di questi peptidi e dimostrarono che stimolano l'assunzione di cibo. Successive indagini, svolte nei ratti e nei topi, hanno confermato che questi peptidi stimolano l'attivazione fisiologica e comportamentale dell'organismo e l'appetito (Edwards et al., 1999; Hayanes et al., 2000, 2002), infatti è stato dimostrato che l'mRNA della prepro-ipocretina è sovra espresso in condizioni di digiuno, indicando che questi neuroni, in qualche modo, percepiscono lo stato del bilancio energetico dell'animale (Sakurai et al., 1998). Recentemente, si è scoperto che il fattore di trascrizione dell'ipocretina a2, target a valle del pathway di segnalazione dell'insulina, è coinvolto in questa regolazione trascrizionale (Silvia et al., 2009). Inoltre, questi neuropeptidi sono implicati nella regolazione dell'emozione, nell'omeostasi energetica e nella dipendenza (Yamanaka et

al., 2003; Akiyama et al., 2004; Boutrel et al., 2005; Narita et al., 2006; Sakurai, 2007). É stato dimostrato che le ipocretine partecipano alla regolazione dell'attività locomotoria (Yamanaka et al., 2003) e prendono parte anche all'integrazione cardiovascolare e locomotoria in risposta a stress acuti (Zhang et al., 2006). Infatti, la somministrazione intracerebroventricolare di ipocretina A porta ad un aumento della pressione arteriosa e della frequenza cardiaca nei ratti in stato di veglia (Samson et al., 2007).

I neuroni sintetizzanti ipocretina sono collocati esclusivamente all'interno dei nuclei ipotalamici laterale (LH) e dorso mediale (DMH) (Sakurai et al., 1998; Swanson et al., 2005), ma inviano estese proiezioni a tutto l'encefalo (Peyron et al., 1998; Nambu et al., 1999) (fig.3). Tramite tecniche di ibridazione in situ è stato dimostrato che i recettori 1 e 2 per l'ipocretina differiscono nella loro distribuzione. L'mRNA del recettore1 è stato osservato in diverse regioni dell'encefalo incluso: l'ippocampo, il nucleo talamico paraventricolare, il nucleo ipotalamico ventromediale, il raphe dorsale, e il locus coeruleus, mentre l'mRNA del recettore2 è prominente in una distribuzione complementare che include la corteccia cerebrale, l'ippocampo, il raphe dorsale e alcuni nuclei ipotalamici comprendenti i nuclei: paraventricolare, tuberomammillare e premammillare ventrale (Marcus et al., 2001).

4.2.2 Neuroni MCH-ergici

All'interno dell'ipotalamo laterale, i neuroni sintetizzanti ipocretina, sono frammisti a quelli che sintetizzano l'MCH. Queste due popolazioni di neuroni ipotalamici sono localizzate nella stessa area, ma sono neurochimicamente distinte, infatti cellule MCH positive non sintetizzano ipocretine e viceversa (Bayer et al., 2002; Swanson et al., 2005). L'MCH, localizzato anch'esso nell'ipotalamo laterale, deriva dal

precursore PRE-PRO-MCH (Bittencourt et al., 1992). L'MCH è stato originariamente scoperto nei pesci e negli anfibi dove regola il cambiamento del colore della pelle, importante fattore di adattamento ambientale. Inoltre, dai primi studi è emerso che la concentrazione dell'MCH nel plasma varia con gli stress ambientali, deponendo a favore di un meccanismo d'azione che coinvolge il circuito ipotalamico (Green J et al., 1991). Successivamente è stato identificato anche nei mammiferi nei quali si pensa che regoli il bilancio energetico (Pissions et al., 2006). Nei roditori, l'MCH agisce via proteine G accoppiate a recettori MCH R1, ed è espresso in strutture olfattive, nel DR, nel VMH, nel PV, nell'area limbica (incluso il setto e l'amigdala) e anche densamente nella porzione esterna del nucleo accumbens (NAc) (Chung et al., 2009). Esseri umani e primati esprimono anche un secondo recettore (MCHR2), ma la sua importanza nell'azione dell'MCH rimane ancora largamente sconosciuta (Bednarek et al., 2002).

I neuroni MCH si possono dividere in due sottogruppi: quello che contiene glutammato e il sottogruppo GABAergico che coesprime CART (Yuan C et al., 2010).

L'MCH è stato caratterizzato come neuropeptide orexinergico che regola l'omeostasi energetica. La sua azione è mediata centralmente, dove trattamenti acuti promuovono l'assunzione di cibo e di acqua nei roditori (Clegg et al., 2003). Trattamenti cronici di MCH o di un agonista dei recettori MCHR1 aumentano l'assunzione di cibo ed il peso corporeo (Shearman LP et al., 2003). L'induzione nei topi di una sovra espressione di MCH, causa obesità, mentre topi senza MCH sono magri a causa dell'ipofagia e di un aumento del metabolismo, ed esibiscono una frequenza cardiaca elevata che suggerisce un aumento del tono simpatico (Borowsky B. et al., 2002).

Gli antagonisti dei recettori MCHR1 riducono il consumo di cibo e il peso corporeo e aumentano la depressione e l'ansia nei roditori. Infatti, gli MCH hanno un

ruolo nel potenziare l'assunzione di cibo indotta dallo stress (Pankevich DE et al., 2010) (Borowsky B. et al., 2002).

4.2.3 Relazioni tra neuroni ipocretinergici e neuroni MCH-ergici

Nel loro insieme, questi dati suggeriscono che le ipocretine e l'MCH partecipano alla coordinazione delle attività dei sistemi somatomotori e autonomici. I premotoneuroni simpatici (SPNs) sono distribuiti in tutto il tronco dell'encefalo; i maggiori cluster di questi neuroni si trovano all'interno di alcune aree e regolano l'attività del sistema nervoso autonomo in risposta allo stress (Kerman et al., 2006). Fra queste aree ci sono anche i neuroni che sintetizzano ipocretina e i neuroni sintetizzanti MCH (Bittencourt et al., 1992; Sakurai et al., 1998). Si è ipotizzato inoltre che un solo sottoinsieme di neuroni ipocretinergici e MCH svolga il ruolo di SPNs. Attraverso alcuni studi è stato dimostrato che sebbene i neuroni MCH positivi siano distribuiti in tutto l'LH, formano due chiari raggruppamenti. Il primo cluster di neuroni MCH è localizzato intorno al fornice (regione perifornicale), mentre il secondo cluster si trova intorno al peduncolo cerebrale (regione peripendicolare). Sebbene i neuroni che sintetizzano ipocretina occupino una simile area all'interno dell'LH, la massa di questi neuroni è in una posizione più mediale rispetto alle cellule MCH positive. Infatti all'interno della regione perifornicale le cellule ipocretina positive sono prevalenti rispetto a quelle MCH positive. Dunque gli SPNs MCH e ipocretina positivi comprendono popolazioni neuronali separate, ovvero i neuroni ipocretina-positivi sono distribuiti maggiormente all'interno della regione perifornicale dell'LH, mentre gli SPNs MCH positivi si trovano primariamente all'interno della suddivisione peripendicolare. Inoltre i due gruppi neuronali potrebbero avere due ruoli differenti: gli SPNs perifornicali ipocretinergici probabilmente partecipano, o meglio, sono attivi

durante il comportamento attivo motivato, ovvero in situazioni di stress eludibile, come la presenza di un rivale o un predatore; gli SPNs peripenduculari MCH positivi partecipano probabilmente all'adattamento passivo, ovvero di fronte a fattori di stress incontrollabili e inevitabili, come un profondo dolore muscolare (Ida T. et al., 2000).

4.3 MODULAZIONE DELL'ATTIVITÀ DEI NEURONI IPOCRETINERGICI

Studi elettrofisiologici hanno identificato diversi modulatori che regolano l'attività dei neuroni ipocretinergici. Studi nei topi hanno dimostrato che l'agonista del recettore ionotropo del glutammato attiva i neuroni ipocretinergici, mentre gli antagonisti riducono la loro attività (Li et al., 2002; Yamanaka et al., 2003b). Questi risultati indicano che i neuroni ipocretinergici sono tonicamente attivati dal glutammato.

La dopamina, la noradrenalina e la serotonina iperpolarizzano e inibiscono i neuroni ipocretinergici tramite, i recettori α_2 e 5-HT_{1A} (Yamanaka et al., 2003b; Muraki et al., 2004; Li and van den Pol, 2005). È noto che la dopamina potenzialmente agisce sia sui recettori dopaminergici, sia sui recettori adrenergici α_2 (Li et al., 2005). Infatti, l'iperpolarizzazione indotta dalla dopamina probabilmente è mediata dai recettori α_2 -adrenergici, essendo necessaria un'alta concentrazione di questo neurotrasmettitore per indurla. Inoltre gli antagonisti α_2 adrenergici, come l'idazipocretinaan, inibiscono l'iperpolarizzazione indotta dalla dopamina (Yamanaka et al., 2006).

Recentemente, è emerso che l'ipocretina è in grado di eccitare i neuroni ipocretinergici tramite i recettori ipocretina 2R (Yamanaka et al., 2010). Questo suggerisce che i neuroni ipocretinergici formano un circuito a feedback positivo attraverso vie dirette ed indirette, per preservare la rete dei neuroni ipocretinergici ad un livello elevato di attività o per un lungo lasso di tempo.

Recentemente è stato rilevato che i neuroni ipocretinergici esprimono recettori per la glicina e che questa inibisce l'attività elettrica dei neuroni ipocretinergici direttamente ed indirettamente (Hondo et al., 2011; Karnani et al., 2011b). Inoltre è stato evidenziato che la neurotensina, una forma solfatata della colecistochinina, l'ossitocina e la vasopressina attivano i neuroni ipocretinergici, mentre il muscimolo, agonista del recettore GABA_A, ed i neurotrasmettitori aminergici inibiscono queste cellule (Tsujino et al., 2005).

Altri fattori che influenzano l'attività dei neuroni ipocretinergici sono: il fattore di rilascio la corticotropina (Winsky-Sommerer et al., 2004), l'ATP (Wollmann et al., 2005), il NPY (Fu et al., 2004), la fluttuazione del livello di pH e di CO₂ (Williams et al., 2007). È degno di nota che i fattori influenzati dall'assunzione di cibo, come il glucosio, la grelina e la leptina, inibiscono l'attività dei neuroni ipocretinergici (Yamanaka et al., 2003a). La grande varietà dei fattori che regolano l'attività dei neuroni ipocretinergici dimostra il ruolo d'integrazione svolto da questi neuroni nel monitorare il ritmo circadiano, il bilancio energetico e il livello di vigilanza.

4.3.1 Ipotalamo laterale e controllo della leptina sui neuroni ipocretinergici

La leptina è un ormone anoressizzante, prodotto dagli adipociti e secreto nel circolo, che regola l'omeostasi energetica e il sistema mesolimbico DA. Il sistema mesolimbico DA regola i comportamenti legati all'insorgenza di dipendenza, in parte, attraverso azioni dirette che coinvolgono l'LH.

Tra le popolazioni neuronali dell'LH regolate dalla leptina ritroviamo: quelle che contengono i neuroni MCH, quelle che contengono i neuroni ipocretinergici e quelle che esprimono il recettore per la leptina, LepRb.

Nel 1950 il Jackson Laboratory identificò una linea di topi che presentava una profonda iperfagia, obesità, infertilità e una severa iperglicemia con conseguente diabete. Successivamente è stato dimostrato che il deficit genetico caratterizzante questo fenotipo era dovuto ad una mutazione sul cromosoma 6 del gene dell'obeso (ob) e che tale gene produce leptina (Zhang, 1994).

Il ruolo che la leptina svolge nel controllo del bilancio energetico è stato sottolineato da alcuni esperimenti condotti in roditori o in esseri umani iperfagici e obesi leptina-deficienti, che descrivono la normalizzazione del fenotipo dopo trattamento con leptina (Farooqi IS et al., 1999; Halaas JL et al., 1995).

Nel 1965 è stata identificata una mutazione genetica sul cromosoma 4 in un altro topo obeso, conosciuto come db/db (Whitely DW et al., 1997). Coleman e colleghi hanno descritto le differenze tra le linee obese ob/ob e db/db di questi topi in unione con dei topi normali, osservandone poi il fenotipo risultante (tecnica nota come Parabiosis). La parabiosis di un topo ob/ob con un topo normale magro conduce ad un fenotipo col peso corporeo ridotto grazie al ripristino di un fattore circolatorio mancante, successivamente rivelatosi essere la leptina, fornito dal genoma del topo magro. Mentre la parabiosis di topo db/db e uno normale e magro non risulta in una perdita di peso nel db/db, suggerendo che il fenotipo obeso non è causato dalla mancanza di leptina circolante, ma probabilmente è dovuto a qualche fattore necessario per la trasduzione del segnale leptina. Infatti, com'è stato verificato in esperimenti successivi, il gene db codifica per la forma lunga del recettore leptina, ovvero LepRb (Bahary N. et al., 1990), la leptina, quindi, si lega alle cellule che esprimono LepRb (White DW et al., 1997; Klok C et al., 2002; Tartaglia LA et al., 1997).

L'azione svolta dalla leptina è mediata da popolazioni di neuroni che esprimono LepRb, diffuse all'interno dell'encefalo (Cohen P. et al., 2001; Scott MM et al., 2009).

All'interno del mesencefalo ci sono molte popolazioni neuronali che esprimono LepRb. Tra queste popolazioni ritroviamo: il raphe dorsale (DR) e il grigio periacqueduttale (PAG), il raphe mediano, il nucleo di Edinger-Westphal e anche la VTA (Scott MM et al., 2009; Leshan RL et al., 2010). Popolazioni neuronali che esprimono il recettore LepRb si trovano anche nell'area mediale preottica (MPOA) e nel nucleo del tratto solitario (NTS), ma è l'ipotalamo che contiene il maggior numero di neuroni LepRb distribuite in aree come quella ventromediale (VMH), dorsomediale e quella dei nuclei premammillari (PMn), come anche quella dell'ipotalamo dorsomediale (DMH) e dell'LH.

In passato, l'ipotalamo laterale è stato identificato come “centro dell'appetito”, mentre il VMH è stato identificato come “centro della sazietà” (Stellar E., 1954), invece, attualmente, più che una settoriale considerazione delle funzionalità, si considera l'esistenza di una rete di interazioni neuronali che genera risposte integrate.

L'arcuato rappresenta un importante centro per quest'interazione. I neuroni dell'arcuato sono sensibili a differenti indicatori periferici dello stato metabolico quali: la leptina, la grelina (ormone prodotto dallo stomaco che stimola l'appetito prima dei pasti e a digiuno) e l'insulina (Schwartz MW et al., 2000). La maggior parte dei neuroni che esprimono i recettori per la leptina sono regolati dalla leptina stessa. I neuroni dell'arcuato producono anche la pro-opiomelanocortina (POMC) neuropeptide anorexigenico, che è il precursore dell'alpha-MSH (ormone stimolante melanociti), e sono attivati dalla leptina.

I neuroni dell'arcuato che esprimono il neuropeptide Y (NPY) ipocretinergico e l'AgRP sono invece inibiti dalla leptina e attivati dalla grelina. Il NPY è un neurotrasmettitore composto da 36 amminoacidi ed un potente stimolatore dell'appetito con un effetto considerevole anti-anoressizzante, facente parte della famiglia del peptide

pancreatico (Tatemoto k., 1982). Il NPY è espresso in varie regioni dell'LH ed è coinvolto in numerosi processi fisiologici che includono l'omeostasi energetica (Morris BJ, 1989). I neuroni LepRb non coesprimono MCH o ipocretina e rappresentano una popolazione unica nell'LH.

I neuroni LepRb dell'LH sono maggiormente distribuiti tra le popolazioni neuronali ipocretinergiche all'interno dell'area perifornicale e entrambi sono circondati dai neuroni MCH. Un trattamento acuto con leptina diminuisce l'espressione di MCH (Sahu A et al., 1998), invece topi con un deficit di leptina aumentano l'espressione di MCH e MHCR1, che viene ridotta in seguito a trattamento con leptina (Tritos NA et al., 1998). Topi con carenza di MCH sono ipofagici e magri. Ciò suggerisce che i segnali provenienti dai neuroni MCH e dalla leptina si antagonizzano (Shimada M et al., 1998). Topi con carenza sia di MCH che di leptina, pesano meno rispetto a topi carenti solo di leptina (ob/ob), invece la carenza sia di MCH che di leptina porta ad un aumento della spesa energetica e dell'attività locomotoria, che quindi potenzia negli animali la perdita di peso (Segal-Lieberman G et al., 2003).

Immediatamente dopo la sua scoperta, l'ipocretina è stata studiata come probabile punto di regolazione del sistema anoressizzante leptinico. La riduzione della leptina, tramite un digiuno acuto, porta all'aumento dell'espressione del neuropeptide ipocretina e del recettore di tipo 1 e aumenta gli input sinaptici eccitatori sui neuroni ipocretinergici. Al contrario il trattamento con leptina inibisce l'espressione dell'ipocretina e l'attività neuronale negli animali normalmente alimentati, in parte riducendo gli input eccitatori sui neuroni ipocretinergici (Cai XJ et al., 1999). La distruzione del segnale leptina comunque deregola il sistema ipocretinergico, infatti i roditori obesi, con ablazione genetica del segnale leptina (topi ob/ob e db/db, e ratti fa/fa), hanno una riduzione dell'espressione di ipocretina che viene ripristinata a livelli

normali attraverso trattamenti con leptina (Yamamoto Y et al., 2000; Louis GW et al., 2010).

Negli uomini obesi, i livelli di ipocretina sono aumentati dalla perdita di peso e dal ripristino della sensibilità alla leptina (Bronsky J et al., 2007). Inoltre l'espressione di ipocretina, di per sé, non è un indicatore dell'appetito, infatti la sovra espressione di ipocretina protegge gli animali da una dieta che induce obesità associata alla diminuzione dell'attività locomotoria e alla riduzione dell'assunzione del cibo.

L'aumento dell'espressione di ipocretina potenzia la perdita di peso data dal trattamento con leptina (Funato H et al., 2009), inoltre la presenza di leptina è cruciale per l'azione dell'ipocretina, infatti la sovra espressione di ipocretina non protegge da una dieta che induce obesità i topi leptina-deficienti (Funato H et al., 2009). Tutti questi dati suggeriscono che il controllo esercitato dalla leptina sui neuroni ipocretinergici è necessario per un adeguato bilancio energetico. Ciò che emerge dai dati trattati fin'ora è la visione dell'ipotalamo laterale come integratore delle risposte fisiologiche a stimoli quali cibo, droghe e stress. Pertanto non è solamente un centro di controllo dell'assunzione di cibo, com'è stato storicamente descritto, ma piuttosto un regolatore di funzioni, come l'attività locomotoria e la spesa energetica, e quindi un integratore fondamentale del bilancio energetico.

4.3.2 Neuroni ipocretinergici e glucosio

Il mantenimento di livelli adeguati di glucosio è necessario come fonte primaria per la sopravvivenza. Esistono meccanismi centrali e periferici che hanno il compito di regolare i livelli di glucosio, innescando cambiamenti adattativi nel rilascio ormonale, nelle diverse funzioni del cervello, e nel comportamento alimentare. Grazie al lavoro pionieristico del ricercatore giapponese Yutaka Oomura sono stati identificati e

caratterizzati neuroni sensibili al glucosio nel sistema nervoso centrale e periferico, incluso l'ipotalamo laterale. I neuroni sensibili al glucosio sono stati classificati in cellule glucosio-inibite (GI- cellule che in risposta ad un aumento della concentrazione di glucosio diminuiscono la loro attività elettrica) e cellule glucosio-eccitate (GE- cellule che aumentano la loro attività elettrica in risposta ad un aumento della concentrazione di glucosio) (Anand BK et al., 1964; Parton LE et al., 2007).

Specificamente è stato dimostrato che, concentrazioni fisiologicamente elevate di glucosio diminuiscono l'eccitabilità ed inibiscono i neuroni ipocretinergici, mentre le stesse concentrazioni aumentano l'eccitabilità dei neuroni MCH, che sono frammisti ai neuroni ipocretinergici, ciò connota la natura GI dei neuroni ipocretinergici e GE dei neuroni MCH. Inoltre si è constatato che una distinta popolazione di neuroni ipocretinergici esibisce solo una transiente risposta inibitoria ad un aumento sostenuto del livello di glucosio permettendo ai neuroni coinvolti di mantenere la sensibilità a piccole fluttuazioni di glucosio (Burdakov D et al., 2005).

Recentemente è stata identificata, nell'ipotalamo laterale, una sottopopolazione di neuroni GI, ipocretina negativa (Liu XH et al., 2001), che esprime il neuropeptide Y (NPY). Diversi studi su topi transgenici, condotti utilizzando la proteina verde fluorescente (GFP) posta sotto il controllo degli elementi regolatori del trascritto NPY, hanno identificato la distribuzione anatomica delle cellule NPY nell'LH (Roseberry et al., 2004). Inoltre, sono state descritte le loro proprietà neurochimiche ed elettriche, la loro attività in risposta a digiuno e a ipoglicemia insulina indotta, e la risposta elettrofisiologica indotta a livello cellulare dalla presenza di glucosio extracellulare (von de ol A.N. et al., 2009), la quale è stata poi confrontata con quella dei sensori glicemici dei neuroni ipocretinergici e dei neuroni MCH. È emerso che il NPY, l'ipocretina e l'MCH vengono espressi in popolazioni non sovrapposte all'interno dell'ipotalamo

laterale. Gli studi hanno anche rivelato che la sensibilità al glucosio dei neuroni NPY dell'LH è significativamente differente da quella dei vicini neuroni ipocretinergici ed MCH, suggerendo che le cellule dell'LH che esprimono NPY rappresentano una nuova popolazione di neuroni glucosio sensibili, che interviene nella rete cerebrale di controllo del metabolismo (Marston O.J.. et al., 2011)

4.3.3 Ipocretina e controllo dell'attivazione fisiologica e comportamentale

Le ipocretine sono due neuropeptidi prodotti esclusivamente da un cluster di neuroni dell'LH, attivi durante il periodo di veglia (de Lecea L et al., 1998; Sakurai et al., 1998). I neuroni ipocretinergici proiettano i loro assoni attraverso tutto l'encefalo (Peyron et al., 1998; Nambu et al., 1999), il che suggerisce la varietà delle loro funzioni.

Sono state osservate numerose proiezioni alle regioni che sono correlate al mantenimento dello stato di veglia come: il nucleo serotoninergico del raphe dorsale (DR), il nucleo noradrenergico del locus coeruleus (LC), i nuclei dopaminergici dell'area ventrale tegmentale (VTA), il nucleo istaminergico tuberо mammillare (TMN) (Peyron C et al., 1998; and de Bourgin P. et al. 2000). Inoltre il ruolo svolto dai neuroni ipocretinergici nella promozione della veglia è evidenziato anche dalla proiezione eccitatoria che inviano ai neuroni colinergici dei nuclei prosencefalici della base (Eggermann et al., 2001), un'area di fondamentale importanza per il mantenimento dello stato di veglia (Alam et al., 1999).

Topi transgenici per il precursore del peptide ipocretinergico, per il recettore ipocretinergico e con l'ablazione dei neuroni ipocretinergici, mostrano seri problemi nella regolazione del ciclo veglia-sonno (Chemelli et al.,1999; Hara et al.,2001; Willie et al.,2003). Coerentemente con ciò che si osserva nei topi transgenici, la mancanza di ipocretina si associa negli esseri umani alla comparsa della narcolessia, patologia in cui

si assiste al manifestarsi di sintomi quali l'ipersomnia diurna, la cataplessia, le allucinazioni ipnagogiche e la paralisi da sonno (Nishino et al., 2000; Peyron et al., 2000; Thannickal et al., 2000). Inoltre il numero dei neuroni ipocretinergici è fortemente ridotto nei pazienti narcolettici, e il livello del peptide nel fluido cerebrospinale è diminuito a livelli non rilevabili (Nishino et al., 2000; Peyron et al., 2000; Thannickal et al., 2000).

Nuovi studi che usano l'optogenetica, una scienza emergente che combina tecniche ottiche e genetiche di rilevazione, allo scopo di sondare circuiti neuronali all'interno di cervelli intatti di mammiferi e di altri animali, in tempi dell'ordine dei millisecondi, hanno rivelato i ruoli fisiologici dei neuroni ipocretinergici in vivo. La fotostimolazione diretta selettiva dei neuroni ipocretinergici che esprimono il canale 2 della rodopsina, aumenta la probabilità della transizione dal sonno non-REM o REM alla veglia (Adamantidis et al., 2007) ed attivano i nuclei promuoventi la veglia come il LC e il TMN (Carter et al., 2009). È stato anche dimostrato che l'inibizione diretta selettiva dei neuroni ipocretinergici che esprimono l'olorodopsina induce sonno NREM (Tsunematsu et al., 2011).

Recentemente, sono state utilizzate proteine naturali e modificate per regolare l'attività di specifici circuiti neuronali in vivo. Ad esempio l'uso di recettori costruiti attivati esclusivamente da farmaci costruiti (Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs approach "DREADD"). Questo metodo implica l'uso di recettori muscarinici modificati, hM3Dq per la stimolazione e hM4Di per l'inibizione, che hanno perso la loro affinità per l'acetilcolina endogena, ma che possono essere attivati da un ligando sintetico (clozapina-N-ossido) che può attraversare la barriera ematoencefalica (Armbruster et al., 2007; Alexander et al., 2009, Sasaki K et al., 2011). Dato che la stimolazione o l'inibizione col metodo DREADD ha un effetto più lungo di quelle

osservate con l'optogenetica, la DREADD rende più facile l'esame degli effetti cronici della modulazione dell'attività di specifici neuroni.

Usando questa tecnica, è stato descritto che l'eccitazione dei neuroni ipocretinergici aumenta in maniera significativa la quantità del tempo trascorso in veglia e diminuisce il tempo trascorso in sonno NREM e in sonno REM, mentre l'inibizione dei neuroni ipocretinergici diminuisce il tempo trascorso in veglia e aumenta quello trascorso in sonno NREM (Sasaki et al., 2011).

I neuroni ipocretinergici proiettano estesamente ai nuclei peduncolo-pontini tegmentali (PPT) e ai nuclei laterodorsali tegmentali (LTD) che a loro volta proiettano numerose afferenze colinergiche a diverse aree dell'encefalo che giocano un ruolo chiave nella regolazione del sonno REM e della veglia (Peyron et al., 1998; Nambu et al., 1999). Infatti, tramite esperimenti elettrofisiologici, è stato dimostrato che la frequenza di scarica dei neuroni colinergici è aumentata dall'ipocretina A (Burlet et al., 2002). Microiniezioni, effettuate nei gatti, di ipocretina A nell'LTD aumentano la quantità di veglia e diminuiscono la quantità di sonno REM (Xi et al., 2001). Questo chiaramente dimostra l'importanza del sistema ipocretinergico nella regolazione del ciclo veglia-sonno. Molti esperimenti farmacologici ed elettrofisiologici convergono sull'idea che il sistema ipocretinergico agisca come un sensore che imposta la soglia dell'attivazione fisiologica e comportamentale dell'organismo, integrando i vari segnali omeostatici (Sutcliffe JG and de Lecea L, 2002, Tupone et al., 2012). La questione comunque permane, ovvero se il rilascio endogeno di ipocretina sia sufficiente a indurre la veglia. La stimolazione ripetuta dei neuroni ipocretinergici aumenta il numero delle transizioni della veglia, suggerendo un meccanismo di modulazione con cui il sistema ipocretinergico promuove l'avvio dell'attivazione fisiologica e comportamentale dell'organismo attraverso il sistema noradrenergico. Oltre a influenzare lo stato di

veglia, i neuroni ipocretinergici sono attivi in una varietà di situazioni fisiologiche, la maggior parte può essere associata con i diversi stati dell'attivazione fisiologica e comportamentale, come il controllo del sistema cardiovascolare, la regolazione neuroendocrina, l'attività locomotoria, il dolore e lo stress.

Per attenuare i sintomi dei disordini del sonno, spesso vengono somministrati psicostimolanti, come le anfetamine, in pazienti narcolettici. È interessante notare che, in questi pazienti, raramente si assiste allo sviluppo di farmaco dipendenza. Questo suggerisce che il sistema ipocretinergico medi l'insorgenza della dipendenza da farmaco. L'ipotalamo laterale, dove sono localizzati i neuroni ipocretinergici, è una regione del cervello storicamente implicata nella ricompensa e nella motivazione, e i neuroni ipocretinergici proiettano diffusamente alle aree del cervello come il LC, il nucleo accumbens, e la VTA (Fadel and Deutch, 2002) che sono implicate nella risposta comportamentale all'abuso da farmaci.

L'ipocretina attiva direttamente i neuroni dopaminergici della VTA (Nakamura et al., 2000; Korotkova et al., 2003). Iniezioni ICV o locali infusioni di ipocretina nella VTA inducono comportamenti motivati o da ricompensa di cibo o da farmaco (Sakurai et al., 1998; Boutrel et al., 2005; Harris et al., 2005) .

Per quanto concerne il controllo del sistema cardiovascolare, è stato dimostrato che iniezioni intracerebroventricolari di ipocretina aumentano la pressione cardiaca e la frequenza cardiaca (Shirasaka et al., 1999), e questi effetti sono aboliti dalla somministrazione dell'antagonista dei recettori α_1 -adrenergici, prazosina, o dell'antagonista dei recettori beta-adrenergici, propranololo, mentre topi transgenici che mancano del peptide ipocretina mostrano una pressione sanguigna più bassa rispetto ai controlli (Kayaba et al., 2003; Zhang et al., 2006). Inoltre esperimenti recenti mostrano come le iniezioni di ipocretina nel raphe, inducano un significativo aumento della

pressione sanguigna e della frequenza cardiaca (Luong and Carrive, 2012). Questi risultati suggeriscono che l'ipocretina stimola fisiologicamente il sistema nervoso autonomo e regola la spesa energetica.

Soprattutto a causa della localizzazione delle ipocretine nell'LH, considerato il centro dell'alimentazione, si pensò che il loro ruolo primario fosse legato all'assunzione di cibo e all'omeostasi energetica. Infatti, i primi studi farmacologici sui neuroni ipocretinergici erano legati alla regolazione dell'appetito. La somministrazione intracerebroventricolare di ipocretina A o ipocretina B aumentava nei ratti l'assunzione di cibo (Sakurai et al., 1998).

Anche se tutto ciò supporta il ruolo fisiologico che hanno le ipocretine nell'assunzione di cibo, una revisione attenta di questi studi suggerisce che l'effetto osservato potrebbe essere attribuito ad un incremento dell'attivazione fisiologica e comportamentale. Ad esempio la maggior parte degli studi che ha dimostrato un aumento dell'assunzione di cibo, ha utilizzato dosi soprafisiologiche che aumentano anche l'attività locomotoria e il comportamento esplorativo di ricerca. I neuroni ipocretinergici sono localizzati nel centro del controllo dell'appetito e esibiscono una connettività reciproca con il circuito ipotalamico che regola il metabolismo, compresi i neuroni ipocretinergici nel nucleo arcuato che esprimono il neuropeptide Y e le cellule anoressizzanti che esprimono pro-opiomelanocortina (Elias CF et al., 1998). Similmente ai neuroni dell'arcuato, l'attività ipocretinergica è direttamente modulata da componenti periferiche che regolano lo stato metabolico, tra cui la leptina, il glucosio e la grelina (Adamantidis A and de Lecea L, 2008).

Sulla base della letteratura esistente, la principale funzione delle ipocretine potrebbe essere il loro coinvolgimento nella regolazione del ciclo veglia-sonno e la modulazione del comportamento. I neuroni ipocretinergici ricevono numerosi input dai

circuiti omeostatici autonomici ed endocrini, inclusi quelli del ciclo circadiano. La somministrazione cronica ICV (sette giorni) di ipocretina A nei ratti, non modifica la normale assunzione di cibo e non causa obesità, inoltre i livelli di glicemia, colesterolo totale e acidi grassi liberi sono nella norma (Yamanaka A et al., 1999). Tuttavia è degno di nota che la somministrazione cronica di ipocretina A induce una differente risposta nell'assunzione di cibo in funzione del ciclo del sonno. Durante la fase di "riposo" diurno, gli animali trattati rimangono svegli, e molto probabilmente come conseguenza mostrano un aumento del consumo di cibo. Così l'aumento transitorio dell'assunzione di cibo indotto da iniezioni farmacologiche di ipocretina A potrebbe essere interpretato come un effetto secondario nel contesto delle fluttuazioni e delle esigenze metaboliche, in accordo con i livelli di vigilanza e di attività fisica (Yamanaka A et al., 1999).

4.4 IPOTALAMO LATERALE E SONNO

Dati recenti hanno mostrato il ruolo centrale svolto dall'ipotalamo laterale nella regolazione del ciclo veglia sonno. In particolare, la somministrazione di muscimolo (agonista GABA_A) nell'LH del ratto riduce la veglia e induce un periodo prolungato di sonno NREM che si accompagna alla completa soppressione del sonno REM (Clement et al. 2012). Mentre l'effetto sulla veglia è stata attribuita alla possibile soppressione dell'attività dei neuroni ipocretinergici dell'LH, la scomparsa del REM è stata ascritta alla inibizione dei neuroni MCH.

La possibilità che i neuroni MCH giochino un ruolo centrale nella genesi del sonno REM deriva da osservazioni che mostrano come iniezioni intracerebroventricolari di MCH nei ratti aumentano il sonno REM e producono risposte bradicardiche e ipotensive (Messina and Overton, 2007). Inoltre i neuroni MCH risultano selettivamente attivati (attivazione di c-Fos) durante il recupero di sonno REM

che segue una privazione di sonno REM nel ratto (Luppi et al., 2013). Infine sono state mostrate proiezioni di tali neuroni MCH c-Fos positivi alla porzione ventrolaterale del grigio periacqueduttale, che contiene neuroni REM-off che inibiscono i neuroni REM-on di SLD e, a seguito di iniezioni di muscimolo nell'LH, sono state individuati neuroni c-Fos positivi nel grigio periacqueduttale ventrolaterale che risultano innervati da neuroni GABAergici (possibilmente neuroni MCH) (Clement et al., 2012). La specificità dell'azione dei neuroni MCH sarebbe sostenuta dal fatto che l'effetto di inibizione del sonno REM segue anche alla somministrazione nell'LH di clonidina, che agisce su recettori α -2 adrenergici che sarebbero presenti solo sui neuroni MCH.

4.5 IPOTALAMO LATERALE E CONTROLLO CARDIOVASCOLARE

Inizialmente si pensava che l'ipotalamo avesse un ruolo fondamentale nel regolare la comparsa di comportamenti complessi (come il ciclo sonno-veglia o il comportamento alimentare), modulando l'attività dei nuclei autonomici del tronco dell'encefalo al fine di adattare la risposta vegetativa al comportamento in essere. Studi effettuati di recente però hanno dimostrato che l'ipotalamo svolge anche un ruolo diretto sulla funzione cardiovascolare, probabilmente agendo sui recettori ipocretinergici distribuiti nelle aree a questo deputate (Shirasaka et al., 2002; Cerri and Morrison, 2005).

Le attività comportamentali come l'esercizio, la lotta, la ricerca di cibo devono essere affrontate dall'organismo con una risposta integrata. Questa risposta si basa sulla coordinazione ipotalamica dell'attivazione dei circuiti somatomotori, ormonali ed autonomici. Infatti risposte cardiovascolari adattative sono mediate da differenti neuropeptidi ipotalamici che sono anche coinvolti nel controllo comportamentale. I neuroni ipocretinergici proiettano al nucleo del tratto solitario (NTS) e al RVML, che

sono parti di un network neuronale critico per la regolazione cardiovascolare e respiratoria, come anche alla colonna intermediolaterale del midollo spinale (Shirasaka T et al., 2003). I neuroni ipocretinergici inviano anche efferenze al RVMM (Berthoud HR et al., 2005), che è criticamente coinvolto nella risposta autonoma di difesa dal freddo e che può mediare effetti autonomici evocati dall'attivazione dell'ipotalamo laterale (Cerri M et al., 2005). Attraverso queste vie di segnalazione, l'ipocretina potrebbe modulare adattamenti cardiovascolari e differenti comportamenti motivati. Per esempio, è stato suggerito un ruolo fisiologico dell'ipocretina in differenti aspetti della risposta di difesa (Kayaba Y et al., 2003). La risposta di difesa è caratterizzata dall'aumento della pressione arteriosa, della frequenza cardiaca, della frequenza respiratoria e delle resistenze nel letto vascolare viscerale, e dalla diminuzione delle resistenze nel letto vascolare delle vie aeree e del muscolo scheletrico. La risposta di difesa evocata dalla stimolazione dell'area perifornicale è attenuata nei modelli murini geneticamente ingegnerizzati che presentano deficienza di ipocretina (Kayaba Y et al., 2003).

La somministrazione intracerebroventricolare (ICV) di ipocretina 1 in ratti svegli aumenta la temperatura corporea, la pressione arteriosa, la frequenza cardiaca, l'attività simpatica del nervo renale e le catecolamine nel plasma (Shirasaka T et al., 2003). La microiniezione di ipocretina nel RVLM aumenta anche la pressione arteriosa e la frequenza cardiaca in ratti sia anestetizzati (Chen CT et al., 2000) che svegli (Machado BH et al., 2002) e attiva i circuiti neuronali che controllano l'attività vagale e simpatica diretta al cuore (Cirello J et al., 2003). Non è noto se simili effetti siano fisiologicamente esercitati da ipocretine endogene durante la veglia e/o durante il sonno. Se confermato, il risultato che la pressione basale arteriosa è più bassa di circa 15

mmHg in topi ipocretina-deficienti rispetto ai controlli, supporterebbe questa interpretazione (Kayaba Y et al., 2003).

4.6 IPOTALAMO LATERALE E CONTROLLO TERMOREGOLATORIO

I neuroni dell'ipotalamo laterale, in particolare quelli ipocretinergici, si trovano quindi in una posizione ideale per integrare l'esecuzione di comportamenti complessi con l'assetto autonomico che tali comportamenti richiedono. In particolare, gli effetti dell'attivazione dei neuroni dell'ipotalamo laterale e quelli diretti dell'ipocretina sulla funzione termoregolatoria sono stati recentemente oggetto di importanti ricerche (Cerri and Morrison, 2005; Tupone et al., 2012; Luong and Carrive, 2012). In tutti questi studi, appare sostanzialmente chiaro che l'attivazione dei neuroni dell'ipotalamo laterale produce un'attivazione simpatica che include l'attivazione degli organi termogenici. In particolare, l'ipocretina sembra agire come un amplificatore di segnale, potenziando l'intensità di ogni risposta termogenica, ed avendo poco effetto in assenza di tale risposta (Tupone et al., 2012).

Nonostante il ruolo attivante che i neuroni dell'LH e l'ipocretina mostrano avere nei confronti degli organi termogenici, non è ad oggi noto quale sia il ruolo di questi neuroni nel mantenimento della temperatura corporea e quali effetti possa avere sull'omeostasi termica la sospensione acuta dell'attività di queste cellule.

5. SCOPO DELLA TESI

In considerazione della capacità di integrare e coordinare lo stato comportamentale con l'attivazione autonoma che caratterizza la funzione dell'ipotalamo laterale, lo scopo di questo studio è stato quello di valutare se gli effetti

sul ciclo veglia-sonno che vengono indotti dalla modificazione dell'attività dei neuroni dell'LH, in particolare l'induzione del sonno NREM e la completa inibizione del sonno REM che seguono all'iniezione di muscimolo nell'LH (Clément et al., 2012), siano il risultato della modificazione di circuiti neuronali specifici per la funzione ipnica o siano invece il riflesso di modificazioni dell'attività autonoma e termoregolatoria, che potrebbero andare a turbare l'equilibrio ipnico solo in via secondaria.

Per meglio valutare gli eventuali effetti autonomici e termoregolatori indotti dalla modificazione dell'attività dei neuroni dell'LH, in questo studio la somministrazione del muscimolo nell'LH del ratto libero di muoversi (ESPERIMENTO A) è stata condotta sia a temperature ambientali termoneutrali, sia a una bassa temperatura ambientale (10 °C). In quest'ultima condizione la termoregolazione è attiva e l'attività simpatica risulta potenziata, disturbando la normale comparsa del sonno e facilitando la comparsa dello stato di veglia. Nello studio si è quindi proceduto al monitoraggio delle variabili cardiovascolari e termoregatorie e ad una attenta analisi del segnale EEG nei diversi stati di veglia e di sonno, per valutarne le caratteristiche di potenza spettrali che qualificano il sonno NREM e le transizioni dal sonno NREM al sonno REM.

Sulla base dei risultati di questo studio, che hanno mostrato che i neuroni dell'LH intervengono in modo acuto e cruciale nei processi termoregolatori durante l'esposizione a una bassa temperatura ambientale, si è provveduto ad esplorare lo specifico ruolo giocato dall'ipocretina nella regolazione della funzione termoregolatoria, con particolare riguardo all'azione su una stazione termoregolatoria chiave come il bulbo rostrale ventromediale (RVMM). Lo studio è stato condotto mediante somministrazione di ipocretina nel RVMM, nel ratto libero di muoversi mantenuto sia a bassa, sia ad alta temperatura ambientale (ESPERIMENTO B).

MATERIALI E METODI

Sono stati utilizzati complessivamente 21 ratti albinici adulti maschi appartenenti al ceppo Sprague-Dawley (Charles River) di peso compreso tra i 250g e i 300g al momento dell'acquisto.

Gli animali, dopo il loro arrivo e dopo essere stati stabulati in coppia in apposite gabbie in plexiglas (Techniplast) contenenti lettieri depolverate, hanno trascorso un periodo di adattamento alle normali condizioni di laboratorio pari ad una settimana. Tali condizioni comprendevano: cibo e acqua ad libitum, temperatura ambiente, ai limiti inferiori della termoneutralità, di $24^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ con un ciclo luce-buio di 12 h:12 h (accensione luce 9:00 di mattina, 100 lux di intensità luminosa a livello della gabbia).

Ogni mattina, all'accensione della luce, un operatore ha provveduto al cambio delle lettieri ed al rifornimento di acqua e cibo.

Gli esperimenti sono stati eseguiti, in accordo con la Direttiva dell'Unione Europea (86/609/EEC), su autorizzazione del Ministero della Salute e sotto la supervisione del Servizio Veterinario Centrale dell'Università di Bologna.

1. INTERVENTO CHIRURGICO

1.1 PREPARAZIONE ELETTRODI

Prima di ogni sessione chirurgica sono stati costruiti gli elettrodi e i trasduttori che venivano impiantati per la registrazione dell'elettroencefalogramma (EEG), dell'elettromiogramma nucale (nuECG) e della temperatura ipotalamica (Thy).

Per la registrazione dell'EEG sono stati usati dei connettori con quattro pin. Su due pin del connettore sono stati fissati attraverso una saldatrice a stagno due cavi in rame della lunghezza di 2 cm e del diametro di 0.3 mm rivestiti da una pellicola isolante. L'estremità libera di questi cavi è stata opportunamente sverniciata per 1 mm

ed inserita all'interno della teca cranica per la registrazione dell'EEG. Al fine di evitare penetrazioni troppo profonde che potessero danneggiare la dura madre durante la sessione chirurgica, sono stati fatti due nodi all'estremità dei cavi con funzione di fermo.

Gli elettrodi EMG sono stati costruiti da coppie di cavi di acciaio inox, (mod. AS 632, Cooner Wire Inc., Chatsworth (CA), USA) rivestiti da una guaina isolante di polietilene, della lunghezza di 8cm (nuEMG), ai quali sono stati rimossi 3mm di guaina isolante alle estremità, e 2mm di guaina a metà lunghezza del cavo.

1.2 TERMISTORI

Per la misura della temperatura ipotalamica (Thy) sono stati usati dei termistori inglobati in goccia di vetro (NTC Thermometrix) del diametro di 0.3 mm. I termistori sono stati inseriti nella punta di un ago 21 G e connesso ad una spinetta a due pin posta nel collo di connessione dell'ago; il tutto è stato isolato con diversi strati di vernice per elettrodi.

Nella giornata precedente l'impianto, i termistori sono stati tarati tramite una procedura durante la quale si è valutata la costanza delle caratteristiche fisiche del trasduttore e si è proceduto alla calibrazione lineare dello stesso. Per fare questo, il termistore è stato immerso in un ampio recipiente d'acqua (bagnetto termico) portata alla temperatura di 39°C, misurata tramite un termometro a mercurio (scala 34° C-42°C), e connesso all'amplificatore in corrente continua usato nelle giornate successive per acquisire i segnali dall'animale. Per valutare la costanza nel tempo delle caratteristiche fisiche del termistore, si è lasciata raffreddare spontaneamente la massa d'acqua che, essendo di elevato volume, ha permesso un calo lento e regolare della temperatura e, quindi, l'effettuazione di misure regolari delle variazioni di impedenza

che il termistore subiva alle diverse temperature raggiunte. Per confrontare il funzionamento del termistore a tempi diversi di utilizzazione, l'impedenza è stata misurata a tre temperature: 38,5 °C, a 37,5°C e a 36,5°C .

1.3 RILEVAZIONE DELLA PRESSIONE ARTERIOSA

Per il rilevamento delle variazioni di pressione arteriosa (PA) è stato utilizzato un catetere (AS 632 DataSciences) collegato ad un trasmettitore telemetrico. Il catetere è stato inserito nell'arteria femorale ed il trasmettitore nella cavità addominale. Prima dell'operazione di cateterizzazione, il catetere è stato opportunamente sterilizzato ponendolo per circa dieci minuti in una soluzione sterilizzante (NU-CIDEX NCX010, Johnson & Johnson).

1.4 CHIRURGIA

Gli animali sono stati sottoposti ad intervento chirurgico dopo una settimana di adattamento alle condizioni di laboratorio. I ratti sono stati preanestetizzati con Diazepam (Valium Roche, 5 mg/Kg intramuscolo) e anestetizzati con Ketavet (Ketamina-HCl, Parke-Davis, 100 mg/Kg intraperitoneale). Dopo aver constatato attraverso piccoli stimoli dolorifici a livello degli arti e delle vibrisse l'avvenuto addormentamento dell'animale si è proceduto alla tricotomia, tramite un rasoio elettrico per piccoli animali, del cranio e della zona addominale lungo la linea che si forma tra i muscoli addominali e la zampa posteriore.

Tutte le aree tricotomizzate sono state disinfettare con Betadine per uso chirurgico per evitare contaminazioni batteriche durante le operazioni a cute aperta.

Nella zona addominale, lungo il seno che si forma tra la parete addominale e la zampa posteriore destra è stata praticata un'incisione per esporre l'arteria e la vena femorale che corre adesa ad essa e successivamente separare i due vasi.

Quindi attraverso delle forbici vascolari è stato praticato un foro nell'arteria nel quale è stato inserito il catetere, precedentemente sterilizzato, della PA fino a risalire nell'aorta addominale. In fine il microtrasmettitore telemetrico collegato al catetere è stato alloggiato e fissato sottocute nella parete addominale (fig. 4).

Il ratto è stato quindi posizionato su un apparecchio stereotassico con l'ausilio di una barra trasversale di appoggio della mascella e due barrette auricolari posizionate all'interno dei meati acustici.

Sono stati praticati: quattro fori (diametro 0,5 mm) alla periferia del campo operatorio, cioè nella porzione antero-laterale per le ossa frontali e nella porzione postero-laterale per le due ossa parietali, che sono serviti per l'alloggiamento delle viti di ancoraggio del castelletto, un foro (diametro 0,5 mm) adiacente al bregma per l'inserimento del termistore ipotalamico, due fori (diametro 0,3 mm) uno sull'osso frontale (-3mm Antero Posteriore (AP) 2mm Latero Laterale (LL) dal bregma) ed uno sull'osso parietale (4mm AP, 2mm LL dal bregma) per l'inserimento rispettivamente dell'elettrodo di riferimento ed esplorante dell'EEG e due fori sulle ossa parietali (coordinate dal bregma: AnteroPosteriore (AP) -2,5; LateroLaterale (LL) +/-1,8; DorsoVentrare (DV) -8,2), per l'inserimento di due cannule guida per effettuare microiniezioni bilaterali nell'ipotalamo laterale (Esperimento A) (fig. 5a) oppure un foro sull'osso occipitale per l'impianto di una cannula guida per microiniezioni nel RVMM (Esperimento B). La cannula è stata posta tra 2mm e 3,3 mm AP 0mm LL 9.5 DV (fig. 5 b).

La cannula guida permette il corretto inserimento della cannula interna per microiniezioni del muscimolo, un agonista selettivo dei recettori GABA_A, e di soluzione salina (0,9%, 100ml) nell' LH. Il tutto è stato poi fissato sul cranio con una resina acrilica autopolimerizzante (ResPal a freddo).

Per verificare il corretto posizionamento della cannula nel RVMM è stato effettuato un test intraoperatorio che è consistito nell'osservare le variazioni di temperatura della coda, mediante termocamera ad infrarosso, in seguito all'iniezione di 100 nl di muscimolo 1mM nel RVMM. Lavori effettuati precedentemente da altri autori dimostrano che l'inibizione dei neuroni del RVMM causa una massiva vasodilatazione (Blessing and Nalivaiko, 2001). La prova viene considerata positiva quando entro 5 minuti dall'iniezione si osserva un aumento della temperatura della coda. In caso di esito negativo si ripete il test a coordinate DV LL differenti. Invece l'animale viene escluso dal piano sperimentale nel caso di duplice negatività del test a coordinate DV LL differenti. Nel caso in cui il test sia positivo la cannula viene fissata ed il campo operatorio ricoperto con una resina acrilica autopolimerizzante (ResPal a freddo) incorporando così anche le spinette degli elettrodi EEG, quella del termistore e le viti di ancoraggio.

Al termine dell'operazione si è proceduto alla disinfezione delle ferite addominali con betadine (Betadine 10% gel Meda Pharma Milano) per uso chirurgico, alla somministrazione intramuscolare di antibiotico ad ampio spettro e ad azione prolungata (1 µl/g di Ampicillina 500mg/5ml; 0,2 µl/g di Amicacina 500mg/10ml) per prevenire eventuali infezioni post operatorie e alla somministrazione sottocutanea di 5 ml di soluzione fisiologica per reidratare l'animale. Infine l'animale è stato tenuto sotto osservazione fino alla comparsa dei primi segni di ripresa dall'operazione e quindi posto

nello stabulario per una settimana per consentirgli di recuperare dall'intervento chirurgico. Ogni animale, dopo il recupero, è stato posto nel box di registrazione, connesso ai cavi per la registrazione delle variabili fisiologiche e lasciato due giorni prima dell'inizio degli esperimenti per consentirne l'adattamento alle condizioni sperimentali.

2. APPARATO DI REGISTRAZIONE

2.1 BOX DI REGISTRAZIONE

La gabbia contenente l'animale è posta all'interno di un congelatore a pozzetto che è stato opportunamente modificato per effettuare un fine controllo della temperatura. Tale controllo avviene per mezzo di un termostato connesso al compressore del congelatore ed a una stufa elettrica (1500W) posta al suo interno. Nel momento in cui la temperatura si discosta da quella settata dall'operatore, il termostato attiva il compressore o la stufa. Inoltre le modifiche apportate a livello dello sportello superiore d'accesso hanno consentito il passaggio dei cavi di registrazione delle variabili fisiologiche, l'alloggiamento di una ventola per una continua aerazione interna, di un impianto video (in bianco e nero Philips) che permette lo studio comportamentale dell'animale, di un sistema telemetrico per la registrazione della pressione arteriosa, di un sistema termografico per il monitoraggio della temperatura cutanea dell'animale e la dotazione di un sistema di illuminazione per mezzo di fibre ottiche (100 lux a livello della gabbia). Un timer, regolato con accensione alle 9:00 del mattino con un ciclo 12h luce/12h buio, ha controllato l'accensione e lo spegnimento della luce.

2.2 POSTAZIONI DI REGISTRAZIONE

La postazione di registrazione, collocata all'interno del box, è costituita da una gabbia rotonda in plexiglass dotata di una rete metallica a maglia larga che funge da fondo mobile. La gabbia è stata dotata di un braccio basculante che possiede un contatto rotante al quale vengono collegati i cavi di registrazione, delle variabili fisiologiche, connessi all'animale.

3. AMPLIFICAZIONE E ACQUISIZIONE DEL SEGNALE

Tutti i segnali bioelettrici registrati (EEG e Thy) sono stati amplificati (mod. Grass 7P511L, Astro-Med Inc, West Warwick (RI),USA) e filtrati. I segnali EEG sono stati filtrati a 0,3 Hz /30 Hz (per il filtro passa-alto) e a 30/2000 Hz (per il passa-basso); invece il segnale THY è stato filtrato a 0,5 Hz (per il passa-alto). Tutti i segnali, dopo una conversione analogico-digitale a 12 bit (CED Micro MK 1401 II), sono stati acquisiti da un hard drive digitale con frequenza di campionamento di 500 Hz per l'EEG, e di 50 Hz per Thy. Il segnale elettroencefalografico è stato sottoposto ogni secondo ad un'analisi spettrale mediante l'algoritmo della trasformata di Fourier (FFT). In questo modo sono stati ottenuti i valori di densità di potenza per le bande Delta (0,75-4,0 Hz) Theta (5,5-9,0 Hz) e Sigma (11,0-16,0 Hz).

Il segnale della pressione arteriosa (PA) è stato registrato telemetricamente, amplificato (DSI physiotel PA-C40, DataSciences) e incorporato digitalmente su un PC con una frequenza di acquisizione di 500 Hz.

4. MICROINIEZIONI NEL RATTO LIBERO DI MUOVERSI

Tutte le microiniezioni sono state eseguite mediante un apparato messo a punto nel nostro laboratorio. Un tubo di teflon della lunghezza di un metro e con un diametro

costante per tutta la lunghezza (D.I.0.2mm, FEP-Tubing 4001005 10X1m Microbiotech/se AB, Stockholm, Sweden) è stato connesso, mediante due connettori a tenuta stagna, da un lato a una siringa di vetro Hamilton da 5 μ l (Hamilton Company, Bonaduz, Switzerland) e dall'altro alla cannula.

La siringa è stata posta su una pompa per microiniezioni (Harvard Apparatus) regolata ad una velocità di infusione pari a 0,3 μ l/min ed il tubo ad essa collegata è stato posizionato su un centimetro posto sotto un microscopio stereoscopico.

Durante ogni iniezione, durata 30 s \pm 5 s, sia il tubo che la cannula sono stati riempiti con la sostanza da iniettare, mentre la siringa con un olio minerale colorato. L'interfaccia colore-sostanza ha permesso all'operatore di visualizzare, mediante il microscopio, il movimento del liquido nel tubo, verificare l'avvenuta iniezione e determinare microscopicamente il volume iniettato. La cannula è stata rimossa non prima dei 30 min seguenti l'iniezione.

Per fare in modo che l'animale non si accorga della procedura d'iniezione, la pompa, il microscopio e l'operatore sono posti all'esterno del box di registrazione.

5. PIANO SPERIMENTALE

5.1 ESPERIMENTO A

Dopo una settimana di recupero dall'intervento chirurgico, gli animali (n=12) sono stati inseriti in due gruppi sperimentali (1 e 2). Gli animali del gruppo 1 sono stati registrati per sei giorni consecutivi alle seguenti condizioni:

- i) giorno1, baseline alla Ta=24°C;
- ii) giorno2, iniezione dell'agonista GABA_A muscimolo (1mM, 100nl, 1 iniezione bilaterale/h iniziando dalle 11:00 fino alla 16:00, per un totale di 6 iniezioni), alla Ta = 24°C;
- iii) giorno 3, recupero, alla Ta= 24°C;
- iv) giorno 4, controllo, alla Ta= 24°C;

- v) giorno 5, iniezione di salina (1mM, 100nl, 1 iniezione bilaterale/ h iniziando dalle 11:00 fino alla 16:00, per un totale di 6 iniezioni), alla $T_a = 24^{\circ}\text{C}$;
- vi) giorno 6, recupero, alla $T_a = 24^{\circ}\text{C}$.

Gli animali del gruppo 2 sono stati registrati per sei giorni consecutivi alle stesse condizioni del gruppo 1 ad eccezione dei giorni di iniezione 2 e 5 in cui gli animali sono stati esposti acutamente alla T_a di 10°C , dalle 9:00 alle 17:00.

5.2 ESPERIMENTO B

Il protocollo sperimentale ha previsto un totale di sei giorni di registrazione degli animali ($n=9$) con un'esposizione in sequenza a tre diverse temperature ambientali (24°C , 32°C , 10°C), che venivano modificate ogni due giorni. In ogni giornata sperimentale ogni animale ha ricevuto una singola iniezione di salina o del neuropeptide Ipocretina (30 pM, 150 nl) effettuate in maniera bilanciata alle diverse temperature.

Le iniezioni sono state praticate durante la mattinata, in un momento di particolare tranquillità dell'animale, e nei giorni in cui era previsto il cambio della temperatura ambientale, questo veniva effettuato quattro ore dopo l'iniezione. Inoltre le microiniezioni sono state effettuate circa 30 min dopo l'introduzione della cannula in modo che le variabili fisiologiche tornassero ai valori di controllo dopo la manipolazione dell'animale.

6. ISTOLOGIA

Alla fine di ogni esperimento gli animali sono stati sottoposti a due iniezioni (per quanto riguarda l'esperimento A) o ad una iniezione (per quanto riguarda l'esperimento B) intracerebrale di 50 nl di colorante (Fast Green 2%) per verificare la localizzazione dei siti di iniezione istologicamente. Successivamente i ratti sono stati anestetizzati e

perfusi per via transcardiaca con 400 ml di PBS 4% a pH 7.4 e 400 ml di paraformaldeide 4%. Il cervello è stato estratto, immerso in paraformaldeide 4% e conservato in saccarosio. Infine è stato tagliato a sezioni coronali. Le sezioni che sono risultate marcate sono state posizionate su dei vetrini e fotografate digitalmente.

7. ANALISI STATISTICA

I risultati dell'esperimento A sono rappresentati dalla media \pm errore standard. Per l'analisi statistica è stata utilizzato il test ANOVA (SPSS 21.0) a due vie, con misure ripetute per un fattore. I risultati del giorno delle iniezioni (giorno 2 e giorno 5) e quelli dei giorni di baseline e di recupero (giorno 3 e giorno 6) sono stati analizzati con differenti finestre temporali. È stato utilizzato il t-test modificato (t^*) sia per i contrasti ortogonali, sia per i contrasti non-ortogonali pre-pianificati (Wallenstein et al., 1980; Winer et al., 1991). Il livello α di significatività per contrasti non-ortogonali è stato modificato secondo il metodo del “Bonferroni” sequenziale (Holm, 1979).

Per l'analisi del giorno d'iniezione, i fattori principali sono stati definiti come segue: i) il fattore “tempo” (che è stato considerato per le misure ripetute), composto da 48 livelli, corrispondenti ad ogni intervallo di 30 minuti dell'intero arco delle 24-h; ii) il fattore “Condizione Sperimentale”, composto da due livelli (Salina e Muscimolo). Tutti i risultati sono stati confrontati tramite il seguente contrasto ortogonale: Salina v.s. Muscimolo.

Per l'analisi dei giorni di baseline e di recupero, i fattori principali sono stati definiti come segue: i) il fattore “tempo” (che è stato considerato per le misure ripetute), composto da 4 livelli, corrispondenti ai periodi di luce e di buio di entrambi i giorni; ii) il fattore “Condizione Sperimentale”, composto da due livelli (Salina e Muscimolo). Per

ogni livello del fattore “tempo”, sono stati usati contrasti ortogonali per confrontare i risultati delle iniezioni di Salina e quelli delle iniezioni di Muscimolo. Per ogni livello del fattore “Condizione Sperimentale”, sono stati usati i seguenti contrasti non-ortogonali: Giorno di Recupero (periodo di luce) vs. Giorno di Baseline (periodo di luce); Giorno di Recupero (periodo di buio) vs. Giorno di Baseline (periodo di buio).

I risultati dell'esperimento B sono rappresentati dalla media \pm errore standard. Per l'analisi statistica è stata utilizzata il test ANOVA (SPSS 21.0) a due vie, con misure ripetute per un fattore, per i risultati dei 6 giorni di iniezione. È stato utilizzato il t-test modificato (t^*) per i contrasti ortogonali pre-pianificati.

Per l'analisi dei giorni d'iniezione, i fattori principali sono stati definiti come segue: i) il fattore “tempo” (che è stato considerato per le misure ripetute), composto da 18 livelli, corrispondenti ad ogni intervallo di 10 minuti dell'arco delle 3-h analizzate; ii) il fattore “Condizione Sperimentale”, composto da due livelli (Salina e Ipocretina). Tutti i risultati sono stati confrontati tramite il seguente contrasto ortogonale: Salina v.s. Ipocretina.

Per tutti i confronti di entrambi gli esperimenti è stato considerato un livello di significatività di $p < 0,05$.

RISULTATI

1. ESPERIMENTO A

1.1 EFFETTI INDOTTI SUL CICLO VEGLIA-SONNO DA INIEZIONI RIPETUTE DI MUSCIMOLO O DI SOLUZIONE SALINA NELL'IPOTALAMO LATERALE

L'inibizione dei neuroni dell'ipotalamo laterale, mediante sei iniezioni di muscimolo, ha indotto un significativo aumento della quantità del sonno NREM sia alla Ta di 24°C che alla Ta di 10°C (fig.7a, 7b). La quantità dei diversi stati comportamentali è espressa come percentuale del tempo totale in intervalli successivi di 30 minuti nelle giornate di somministrazione delle microiniezioni (giorno 2 e giorno 5) e di 12 ore nelle altre giornate (giorno 1, 3, 4 e 6). Alla Ta di 24°C, si assiste ad un aumento significativo della quantità di sonno NREM durante il periodo delle iniezioni, con un picco dopo la seconda iniezione ($93,6 \pm 3,1$ %, $p < 0.05$ rispetto alla salina), che rimane significativamente più alta rispetto alla salina per l'intero periodo delle iniezioni (fig.7a).

Alla Ta di 10°C le iniezioni di muscimolo inducono un significativo aumento della quantità di sonno NREM che raggiunge un picco dopo la terza iniezione ($90.5 \pm 4,9$ %, $p < 0.05$ rispetto alla salina) (fig.7b). Un picco negativo significativo nella quantità di sonno NREM (fig.7b) emerge tra le 20:00 e le 21:00 associato ad un picco positivo della quantità di veglia ($70,6 \pm 9,1$ %, $p < 0.05$ rispetto alla salina) (fig.6b). Non si assiste a significativi cambiamenti nella quantità di sonno NREM nel giorno di recupero rispetto alla salina (fig.7b).

Durante l'inibizione dei neuroni dell'LH, la potenza della banda Delta dell'EEG nel sonno NREM aumenta significativamente sia alla Ta di 24°C, sia alla Ta di 10°C (fig. 10a , 10b), mentre la potenza della banda Sigma nel sonno NREM si riduce

significativamente ad entrambe le temperature di esposizione ambientale in confronto con la soluzione salina (fig. 11a, 11b). Le potenze delle diverse bande dell'EEG sono espresse come variazione percentuale rispetto al valore medio (posto a 100) della giornata di baseline.

Alla Ta di 24°C, la potenza della banda Delta in sonno NREM aumenta rapidamente dopo la prima iniezione di muscimolo, raggiungendo un picco dopo la terza iniezione ($138,3 \pm 12,0 \%$, $p < 0,05$ rispetto alla soluzione salina), e ritornando ad un livello normale prima della fine del periodo delle iniezioni (fig. 10a).

Per quanto riguarda la potenza della banda Sigma (fig. 11a), essa è stata drasticamente ridotta dopo la prima iniezione di muscimolo ed è rimasta molto bassa per l'intero periodo delle iniezioni (nadir: $40,3 \pm 5,8 \%$, $p < 0,05$ rispetto alla salina), per ritornare lentamente a valori normali alla fine del periodo di luce.

Alla Ta di 10°C, la potenza della banda Delta nel sonno NREM è aumentata rapidamente dopo la prima iniezione di muscimolo ed è rimasta significativamente elevata per l'intero periodo delle iniezioni (picco a $155,7 \pm 18,0 \%$, $p < 0,05$ rispetto alla salina) (fig. 10b). Durante la giornata di recupero, la potenza Delta subisce un rebound negativo, risultando cioè inferiore a quella del periodo di baseline, che è significativamente minore rispetto a quello osservato dopo salina (periodo di luce: $84,4 \pm 5,5 \%$, $p < 0,05$ rispetto alla salina; periodo di buio: $83,9 \pm 7,3 \%$, $p < 0,05$ rispetto alla salina) (fig. 10b). La potenza della banda Sigma nel sonno NREM si riduce anche drasticamente, e rimane significativamente più bassa (nadir: $42,7 \pm 3,7 \%$, $p < 0,05$ rispetto alla salina) (fig. 11b).

Lo spettro di potenza dell'EEG del sonno NREM, durante l'inibizione dei neuroni dell'LH, mostra un chiaro aumento delle frequenze al di sotto dei 2Hz alla Ta di 24°C e sotto i 3Hz alla Ta di 10°C, e ad entrambe le temperature di esposizione

ambientale si è osservata una drastica diminuzione di tutte le componenti spettrali sopra ai 7 Hz (fig. 12 c, 12 g).

Il sonno REM è stato totalmente abolito, per poche ore, dopo la prolungata inibizione dei neuroni LH ad entrambe le temperature ambientali (fig. 8a, 8b).

Si assiste ad una drastica diminuzione nella quantità di sonno REM con l'esposizione a Ta di 10°C durante le iniezioni di salina, ma intorno alle 15:00 il sonno REM appare nuovamente. La quantità di sonno REM persa durante il periodo delle iniezioni è stata completamente recuperata all'interno dello stesso giorno (fig. 8b)

I cambiamenti nella quantità di veglia indotti dall'iniezioni nell'LH rispecchiano ciò che è stato descritto per il sonno NREM ad entrambe le temperature di esposizione ambientale (fig. 6a, 6b).

La potenza della banda Theta durante la veglia è stata drasticamente ridotta dalle iniezioni di muscimolo sia alla Ta di 24°C (nadir: $47,4 \pm 6,8$ %, $p < 0,05$ rispetto alla salina) (fig. 9a) che alla Ta di 10°C (nadir: $63,2 \pm 3,1$ %, $p < 0,05$ rispetto alla salina) (fig. 9b), ritornando a livelli normali dopo poche ore dall'ultima iniezione (fig. 9a, 9b).

Gli animali del gruppo B hanno mostrato un aumento nella potenza della banda Theta durante la notte successiva alla giornata sperimentale in cui sono state praticate le iniezioni nell'LH (fig. 9b). Nel giorno di recupero, non sono state osservate differenze significative (fig. 9a, 9b).

Lo spettro delle potenze dell'EEG della veglia, durante il periodo dell'inibizione dei neuroni dell'LH, ha mostrato un chiaro aumento nelle frequenze al di sotto dei 4 Hz ad entrambe le temperature ambientali, e una drastica diminuzione nella frequenza della banda Theta (fig. 12d, 12h). Le iniezioni di salina hanno prodotto uno spostamento verso destra della regione Theta, che è risultata più veloce di 1.5 Hz (fig. 12d, 12h).

1.2 EFFETTI INDOTTI SULLA TEMPERATURA IPOTALAMICA DA INIEZIONI RIPETUTE DI MUSCIMOLO O DI SOLUZIONE SALINA NELL'IPOTALAMO LATERALE

Alla temperatura di 24°C, le ripetute iniezioni di salina hanno provocato un significativo aumento della temperatura ipotalamica, paragonato a ciò che si è osservato durante le iniezioni di muscimolo (picco: $37,8 \pm 0,3$ °C, $p < 0.05$) (fig. 13a). Anche alla Ta di 10°C, le iniezioni di salina hanno indotto un aumento della temperatura ipotalamica, mentre subito dopo la prima iniezione di muscimolo nell'ipotalamo laterale si è osservata una diminuzione significativa della temperatura dell'ipotalamo che raggiunge un nadir di $35,5 \pm 0,2$ °C ($P < 0,05$, rispetto alla salina) dopo tre ore, da valori precedenti l'iniezione di $37,1 \pm 0,4$ °C (fig. 13b). La diminuzione della temperatura ipotalamica non è stata causata da un aumento della dissipazione termica, dato che la coda non ha mostrato significativi cambiamenti nella temperatura rispetto alla salina, rimanendo vasocostretta (la temperatura della coda dopo due ore dall'inizio delle iniezioni di muscimolo risulta essere: $17,1 \pm 0,4$ °C) (fig. 14). La temperatura ipotalamica, è ritornata rapidamente a valori fisiologici nonostante le successive iniezioni di muscimolo, rimanendo inoltre significativamente più alta rispetto a quanto osservato in seguito ad iniezioni di salina, per il resto della giornata sperimentale (fig. 13b). Non si osservano differenze significative nei giorni precedenti e successivi il giorno di iniezione (fig. 13a, 13b).

1.3 EFFETTI INDOTTI SULLA PRESSIONE ARTERIOSA MEDIA DA INIEZIONI RIPETUTE DI MUSCIMOLO O DI SOLUZIONE SALINA NELL'IPOTALAMO LATERALE

Alla Ta di 10°C, la pressione arteriosa media (PAM) mostra un significativo aumento passando da 94 ± 2 mmHg a 120 ± 4 mmHg durante il giorno della somministrazione di salina e da 100 ± 4 mmHg a 121 ± 3 mmHg durante il giorno della somministrazione di muscimolo (fig. 15b).

La somministrazione di muscimolo non ha indotto alcun effetto sulla PAM, quindi non sono state riscontrate differenze significative fra il periodo delle iniezioni di salina e quello delle iniezioni di muscimolo (fig. 15a, 15b). Dopo il ritorno della Ta a 24°C, la PA media è diminuita, ritornando a valori simili a quelli del giorno di controllo. Al termine del periodo di iniezione di muscimolo, gli animali così trattati mostrano un aumento della PA media nel periodo compreso fra le 19:00 e le 20:00, che passa da 104 ± 3 mmHg a 109 ± 3 mmHg significativamente ($P < 0.05$) diverso da quando osservato dopo il periodo di iniezioni di salina (fig. 15a, 15b). Nessuna differenza significativa è stata rinvenuta fra i due gruppi nei giorni di controllo e di recupero (fig. 15a, 15b).

1.4 EFFETTI INDOTTI SULLA FREQUENZA CARDIACA DA INIEZIONI RIPETUTE DI MUSCIMOLO O DI SOLUZIONE SALINA NELL'IPOTALAMO LATERALE

Alla Ta di 24°C, la frequenza cardiaca (FC) è risultata significativamente più alta dopo le iniezioni di salina, in media 381 ± 14 bpm, rispetto a quelle di muscimolo 341 ± 15 (fig. 16a). Durante l'esposizione acuta alla Ta di 10°C si è avuto un rapido aumento della frequenza cardiaca, da 367 ± 36 bpm a 456 ± 15 bpm nel giorno di somministrazione di muscimolo, e da 370 ± 27 bpm a 453 ± 10 bpm nel giorno di somministrazione di salina, che è stato solo parzialmente antagonizzato, in una limitata finestra di tempo, dalle iniezioni di muscimolo che hanno portato il valore della FC a

427 \pm 16 bpm ($P < 0.05$ rispetto alla salina) (fig. 16b). Nessuna differenza significativa fra i due gruppi è stata riscontrata nel periodo compreso fra le 9:00 e le 11:00 (fig. 16a, 16b). Alla fine del periodo di somministrazione di muscimolo, la frequenza cardiaca torna rapidamente a valori comparabili a quelli osservati dopo le iniezioni di salina per tutto il periodo di esposizione a 10°C. Il ripristino della Ta a 24°C, induce un calo della FC in entrambi i gruppi, fra cui non si evidenziano differenze significative nel resto del periodo sperimentale (fig. 16b).

2. ESPERIMENTO B

2.1 EFFETTI INDOTTI SUL CICLO VEGLIA-SONNO DALL'INIEZIONE DI IPOCRETINA O DI SOLUZIONE SALINA NELL'RVMM

L'iniezione del neuropeptide ipocretina nell'RVMM, ha indotto un significativo aumento della quantità di veglia alla Ta di 24°C e alla Ta di 10°C (fig. 17a, 17c). Mentre quest'effetto non si è verificato quando gli animali sono stati esposti a Ta 32°C (fig. 17b).

La quantità dei diversi stati comportamentali è espressa come percentuale del tempo totale in intervalli successivi di 10 minuti nelle giornate di somministrazione delle microiniezioni.

Alla Ta di 24°C, si assiste ad un significativo aumento della quantità di veglia successivo all'iniezione di ipocretina, con un picco verificatosi 20 minuti dopo tale iniezione (97,5 \pm 17 %, $p < 0,05$ rispetto alla salina) (fig. 17a), associato ad un picco negativo della quantità di sonno NREM (2,5 \pm 1,7 %, $p < 0.05$ rispetto alla salina) (fig. 18a). La quantità di veglia rimane significativamente più alta, rispetto a quanto si osserva dopo

l'iniezione di salina, per i successivi 30 minuti. Lo stesso andamento riscontrato nella veglia (fig. 17a), si osserva anche per il sonno NREM, ma con verso opposto (fig. 18a).

Dopo circa 150 minuti dall'inizio della registrazione si assiste ad un picco significativo in veglia rispetto ai valori registrati dopo l'iniezione di salina nella stessa finestra temporale ($50,9 \pm 10,4$ %, $p < 0,05$ rispetto alla salina) (fig. 17a), associato ad un picco negativo della quantità di sonno NREM ($44,4 \pm 9,4$ %, $p < 0,05$ rispetto alla salina) (fig. 18a).

Alla Ta di 32°C l'iniezione di ipocretina non induce un significativo aumento della quantità di veglia, fatta eccezione per il valore registrato 20 minuti dopo l'iniezione del neuropeptide ($52,3 \pm 9,4$ p < 0.05 rispetto alla salina) (fig. 17b), associato ad un picco negativo della quantità di sonno NREM ($41,5 \pm 8,7$ %, $p < 0.05$ rispetto alla salina) (fig. 18b). Nel periodo di tempo successivo, la quantità di veglia ritorna a valori non significativi rispetto a quelli registrati dopo l'iniezione di salina eccetto che per due valori significativamente minori rispetto a quelli registrati in salina, a 170 e 180 minuti dall'inizio della registrazione ($23,7 \pm 8,9$; $22,0 \pm 9,4$, $p < 0,05$ rispetto alla salina) (fig. 17b), accompagnati da due picchi positivi della quantità di sonno NREM ($63,5 \pm 7,9$; $67,2 \pm 8,9$, $p < 0,05$ rispetto alla salina) (fig. 18b).

Alla Ta di 10°C si assiste ad un significativo aumento della quantità di veglia successivo all'iniezione di ipocretina, con un picco verificatosi 20 minuti dopo tale iniezione ($85,7 \pm 8,0$ % , $p < 0,05$ rispetto alla salina) (fig. 17c), associato ad un picco negativo della quantità di sonno NREM ($14,3 \pm 8,0$ %, $p < 0,05$ rispetto alla salina) (fig. 18c). La quantità di veglia rimane significativamente più alta, rispetto a quanto si osserva dopo l'iniezione di salina, nei successivi 10 minuti. Dopo 100 e 110 minuti dall'inizio della registrazione, si verificano due picchi negativi significativi della quantità di veglia ($48,9 \pm 9,9$ %; $45,4 \pm 7,8$, $p < 0.05$ rispetto alla salina) (fig. 17c),

associati ad un picco positivo della quantità di sonno NREM a 110 dall'inizio della registrazione ($52,3 \pm 7,1$, $p < 0,05$ rispetto alla salina) (fig. 18c).

L'iniezione di ipocretina induce una modesta modificazione della quantità di sonno REM alle tre temperature di esposizione (fig. 19a, 19b, 19c).

Alla temperatura di 24°C, 20 minuti e 50 minuti dopo l'iniezione di ipocretina, la quantità di sonno REM è pari a 0 ed è significativamente minore rispetto a quanto osservato in salina ($p < 0,05$ rispetto alla salina) (fig. 19a). Inoltre 170 minuti dopo l'inizio della registrazione, si osserva un valore negativo significativo della quantità di sonno REM ($8,3 \pm 4,8$ %, $p < 0,05$ rispetto alla salina) (fig. 19a).

Alla temperatura di 32°C, 30 minuti dopo l'iniezione di ipocretina si ha una diminuzione significativa della quantità di sonno REM, rispetto alla salina ($5,0 \pm 3,5$ %, $p < 0,05$ rispetto alla salina) (fig. 19b).

Alla temperatura di 10°C, nei primi dieci minuti di registrazione, si osserva un picco negativo della quantità di sonno REM, rispetto al controllo ($1,5 \pm 1,0$ %, $p < 0,05$ rispetto alla salina) (fig. 19c); a 30 minuti dall'iniezione di ipocretina si ha un picco significativamente più basso della quantità di sonno REM rispetto a quanto accade dopo iniezione di salina ($0,5 \pm 0,5$ %, $p < 0,05$ rispetto alla salina) (fig. 19c). Inoltre 70 minuti dopo l'iniezione di ipocretina si osserva un picco significativamente più alto di quanto osservato nel controllo ($9,18 \pm 4,13$, $p < 0,05$ rispetto alla salina) (fig. 19c).

2.2 EFFETTI INDOTTI SULLA TEMPERATURA IPOTALAMICA DALL'INIEZIONE DI IPOCRETINA O DI SOLUZIONE SALINA NELL'RVMM

Alla temperatura ambientale di 24°C, 50 e 60 minuti dopo l'iniezione di ipocretina si osserva un aumento significativo della temperatura ipotalamica ($37,4 \pm 0,3$ °C; $37,5 \pm 0,3$, $p < 0,05$, rispettivamente, rispetto alla salina) (fig. 20a).

Alla temperatura ambientale di 32 °C non si osservano aumenti significativi successivi all'iniezione di ipocretina (fig. 20b).

Alla temperatura ambientale di 10°C, a partire dai 10 minuti successivi all'iniezione di ipocretina si assiste ad un aumento della temperatura ipotalamica, che diventa significativo 20 minuti dopo l'iniezione e permane significativo per i successivi 30 minuti (picco: $37,3 \pm 0,3$ °C , $p < 0.05$ rispetto alla salina) (fig.20c).

Dopo 130 e 140 minuti dal momento dell'iniezione, si verificano due picchi positivi di aumento della temperatura ipotalamica ($37,3 \pm 0,4$ °C; $37,4 \pm 0,4$ °C, $p < 0.05$, rispetto alla salina) (fig. 20c).

2.3 EFFETTI INDOTTI SULLA PRESSIONE ARTERIOSA MEDIA DALL'INIEZIONE DI IPOCRETINA O DI SOLUZIONE SALINA NELL'RVMM

Alla temperatura ambientale di 24°C, dopo l'iniezione di ipocretina si assiste ad un aumento significativo della PAM, che permane significativamente più alta del controllo per i successivi 40 minuti (picco: $112,5 \pm 2.0$, $p < 0,05$ rispetto alla salina) (fig. 21a).

A partire dai 150 minuti ai 170 minuti dall'inizio della registrazione, si verifica un aumento significativo della PAM rispetto al controllo (picco: $108,9 \pm 1.7$, $p < 0,05$ rispetto alla salina) (fig. 21a).

Alla temperatura di 32°C, 40 minuti dopo l'iniezione del neuropeptide si verifica un picco significativo di aumento della PAM ($95,2 \pm 3,4$, $p < 0,05$ rispetto alla salina) (fig. 21b).

Inoltre dopo 180 minuti dall'inizio della registrazione si osserva un picco negativo della PAM ($90,9 \pm 2,4$, $p < 0,05$ rispetto alla salina) (fig. 21b).

Alla temperatura ambientale di 10°C, 30 minuti dopo l'iniezione del neuropeptide si verifica un picco significativo di aumento della PAM ($119,8 \pm 2,0$, $p < 0,05$ rispetto alla salina) (fig. 21c). Inoltre, dopo 120 minuti dall'inizio della registrazione, si osserva un aumento significativo della PAM che rimane tale per i successivi 30 minuti (picco: $125,0 \pm 2,1$, $p < 0,05$ rispetto alla salina) (fig. 21c).

2.4 EFFETTI INDOTTI SULLA FREQUENZA CARDIACA DALL'INIEZIONE DI IPOCRETINA O DI SOLUZIONE SALINA NELL'RVMM

Alla temperatura ambientale di 24°C, dopo l'iniezione di ipocretina si assiste ad un aumento della FC che diventa significativo a partire dai 10 minuti successivi all'iniezione del neuropeptide e che permane significativamente più alto del controllo per i successivi 30 minuti (picco: $352,8 \pm 8,4$, $p < 0,05$ rispetto alla salina) (fig. 22a).

Alla temperatura di 32°C, 40 minuti dopo l'iniezione del neuropeptide si verifica un picco significativo di aumento della FC ($298,6 \pm 6,9$, $p < 0,05$ rispetto alla salina) (fig. 22b). Non si osservano, a questa temperatura ambientale, ulteriori effetti significativi.

Alla temperatura ambientale di 10°C, 10 minuti dopo l'iniezione del neuropeptide si verifica un picco significativo di aumento della FC ($447,1 \pm 7,0$, $p < 0,05$ rispetto alla salina) (fig. 22c). Inoltre, 110 minuti dall'inizio della registrazione si

osserva un picco negativo significativo della FC ($444,4 \pm 11,5$, $p < 0,05$ rispetto alla salina) (fig. 22c).

DISCUSSIONE

I dati presentati mostrano che, come descritto da Clement et al. (2012), la prolungata inibizione dei neuroni dell'ipotalamo laterale in ratti esposti ad una temperatura ambientale termoneutrale (T_a , 24°C) induce un drastico aumento della quantità di sonno NREM ed una totale soppressione della quantità di sonno REM. L'aumento della quantità di sonno NREM è caratterizzato da un concomitante aumento dell'attività delle onde lente (E-SWA). Questi effetti sono stati anche quando i neuroni dell'LH sono stati inibiti in ratti esposti acutamente ad una bassa temperatura ambientale (10°C), condizione nota per non essere favorevole al sonno (Cerri et al., 2005) e, plausibilmente, non sono stati causati da cambiamenti nell'attività del sistema nervoso autonomo.

L'aumento della quantità del sonno NREM, come anche del manifestarsi dell' E-SWA, può essere ragionevolmente interpretata come causata dall'inibizione dei neuroni ipocretinergici localizzati nell'ipotalamo laterale. Molte osservazioni presenti in letteratura, sono coerenti con questa interpretazione. È stato dimostrato, per esempio, che l'inibizione acuta dei neuroni ipocretinergici per via optogenetica è sufficiente ad una rapida induzione di onde lente nell'EEG (Tsunemastu et al., 2012); inoltre, l'antagonismo farmacologico per via sistemica dell'ipocretina, in molti animali, induce un aumento nella quantità di sonno NREM (Brisbare-Roch et al., 2007). Questa interpretazione è in apparenza contestata da recenti dati che mostrano che l'inibizione per via optogenetica della durata di un'ora dei neuroni ipocretinergici nei topi (Tsunematsu et al., 2013) è efficace nell'indurre un aumento della quantità di sonno NREM quando condotta durante il periodo di buio, ma non durante il periodo di luce (quando l'effetto è stato osservato nel nostro studio). Tuttavia, in questo studio, la quantità estremamente elevata di sonno NREM (oltre 50 minuti nell'ora analizzata)

presente nelle condizioni di controllo (durante il periodo di luce) ha probabilmente mascherato, l'effetto ipnoinducente del trattamento.

Sebbene il tracciato dell'EEG durante l'inibizione dell'LH non mostri anomalie evidenti, la caratteristica dello spettro EEG durante il sonno NREM e durante la veglia sembra differente rispetto alla loro controparte fisiologica. In particolare, lo spettro dell'EEG durante il sonno NREM, presenta un largo aumento della potenza al di sotto dei 2Hz (l'E-SWA) ed una drastica riduzione della potenza in tutte le porzioni più veloci dello spettro. Anche lo spettro EEG della veglia è caratterizzato da un aumento nella potenza della regione a bassa frequenza che è concomitante ad una leggera riduzione nella potenza della regione ad alta frequenza. Sebbene questi cambiamenti spettrali possano essere attribuiti al silenziamento dei neuroni ipocretinergici (Tsunematsu et al., 2011), è stato dimostrato che, negli esseri umani, il blocco farmacologico dei neuroni ipocretinergici non induce significativi cambiamenti nello spettro delle potenze del sonno NREM (Bettica et al., 2012; Fox et al., 2013). Inoltre, è stato dimostrato che l'attività dei neuroni ipocretinergici (Takahashi et al., 2008) viene fortemente ridotta durante il sonno NREM fisiologico, a livelli molto simili a quelli ottenuti tramite microiniezioni di muscimolo. L'aumento osservato nella potenza delta e la diminuzione nella potenza delle frequenze più veloci potrebbe suggerire un ruolo nella modulazione dello spettro delle potenze EEG sia per i neuroni MCH che per la rimanente popolazione neuronale non ipocretinergica nell'LH. L'inibizione per via optogenetica dei neuroni MCH (Jego et al., 2013) produce un drastico spostamento del ritmo Theta durante il sonno REM verso regioni più lente dello spettro dell'EEG, suggerendo che l'attività dei neuroni MCH potrebbe in qualche modo essere rilevante per questa regione dello spettro EEG. Concludendo, il sonno NREM indotto dall'inibizione dei neuroni LH può essere considerato come uno stato con pure

SWA (senza intrusioni di sonno REM, veglia o transizioni di fase) che è generato non solo dalla riduzione del tono ipocretinergico, ma richiede l'inibizione di una più vasta popolazione di neuroni.

Mentre l'inibizione dei neuroni LH alla $T_a=10^{\circ}\text{C}$ ha indotto ipotermia, confermando il ruolo dei neuroni LH nella termoregolazione e, apparentemente, provvedendo ad una spiegazione per la soppressione del sonno REM, la temperatura ipotalamica è rimasta a livelli normali alla temperatura ambientale di 24°C , suggerendo che è improbabile che un'inibizione della termogenesi sia la causa dell'assenza del sonno REM. La totale soppressione del sonno REM potrebbe essere attribuita all'inibizione dell'attività dei neuroni MCH, localizzati nell'area dell'LH. È stato dimostrato che i neuroni MCH sono neuroni REM-on (Hassani et al., 2009) ed è stato proposto che la loro attività sia necessaria per la comparsa del sonno REM (Clement et al., 2012). Tuttavia, l'inibizione selettiva per via optogenetica dei neuroni MCH (Jego et al., 2013) riduce la comparsa di sonno REM, ma non la abolisce totalmente. È stata anche identificata nell'ipotalamo laterale una popolazione neuronale REM-on GABAergica, non orexinergica, non-MCH, (Hassani et al., 2010), che potrebbe giocare un ruolo significativo nella modulazione della comparsa di sonno REM.

La forte riduzione della banda sigma durante il sonno NREM suggerisce che, durante il periodo di inibizione dell'LH, non vengano fatti tentativi per entrare in sonno REM, dato che la transizione da sonno NREM a sonno REM è caratterizzata da un forte aumento della potenza sigma. (Capitani et al., 2005). Infatti la soppressione del sonno REM causata dall'inibizione dell'LH è unica dato che è accompagnata dall'E-SWA del sonno NREM e differisce sostanzialmente da quanto, ad esempio, si osserva dopo l'esposizione ad una bassa temperatura ambientale (Cerri et al., 2005). Durante l'esposizione a bassa temperatura ambientale il sonno REM è tonicamente abolito

mentre il sonno NREM è ancora presente (> 50%), ma il pattern di sonno è caratterizzato da una serie di tentativi abortiti di passare dal sonno NREM al sonno REM. Quindi, mentre l'esposizione al freddo sembra bloccare i tentativi di entrare in sonno REM successivamente all'attivazione del suo network di generazione, l'abolizione del sonno REM attraverso l'inibizione dei neuroni LH, sembra essere una conseguenza dell'inibizione dei meccanismi intrinseci che lo generano. È degno di nota che, durante l'inibizione dei neuroni dell'ipotalamo laterale, il debito di sonno REM viene totalmente compensato, supportando l'idea che la quantità di sonno REM persa sia l'unico determinante della quantità di sonno REM recuperata (Amici et al., 2008).

I nostri risultati dimostrano anche che i neuroni dell'LH hanno un ruolo limitato nella regolazione dell'attività del sistema nervoso autonomo. È stato dimostrato che i neuropeptidi MCH ed ipocretina riducono (Messina and Overton, 2007) ed inducono (Tupone et al., 2011; Luong and Carrive, 2012) rispettivamente l'attivazione simpatica. In accordo con queste osservazioni è ragionevole interpretare i cambiamenti dei parametri autonomici osservati nel nostro esperimento come causati dall'inibizione dei neuroni ipocretinergici.

In accordo con quanto è stato descritto dopo la somministrazione sistemica di un antagonista ipocretinergico (Furlong et al., 2009), non sono stati osservati nel presente studio cambiamenti significativi dei parametri cardiovascolari. L'inibizione dell'LH non modifica l'aumento nella frequenza cardiaca e nella pressione arteriosa causato dall'esposizione al freddo e ha limitati effetti sulla frequenza cardiaca alla temperatura ambientale di 25 °C. L'assenza di effetti sul sistema cardiovascolare dopo l'esposizione al freddo è consistente con quanto descritto dopo somministrazione nei ratti dell'antagonista dei recettori HCRT1-R e HCRT2-R almorexant (Furlong et al., 2009),

suggerendo che i neuroni LH non sono coinvolti nella modulazione termoregolatoria dei parametri cardiovascolari.

La funzione termoregolatoria è stata più interessata dall'inibizione dei neuroni LH rispetto alla regolazione cardiovascolare. Alla temperatura ambientale di 10°C, la temperatura cerebrale diminuisce significativamente durante la somministrazione delle prime 3 dosi di muscimolo, ma questa diminuzione si arresta e rapidamente si osserva un ritorno alla termoneutralità, nella seconda metà del periodo di inibizione dei neuroni dell'LH. Dato che la diminuzione della temperatura cerebrale non è stata causata da un aumento della dissipazione termica, non essendo stata osservata nessuna vasodilatazione a livello cutaneo, è ragionevole supporre che sia stata causata dalla riduzione della termogenesi. È stato suggerito che l'ipocretina abbia la capacità di amplificare un tono termogenico già presente (Tupone et al., 2011). Se fosse così, i nostri dati suggerirebbero che i neuroni ipocretinergici sono tra i primi ad essere attivati in risposta all'esposizione ad ambienti freddi per far sì che venga mantenuta una temperatura corporea costante dopo tale esposizione, potenziando il tono termogenico di base. Nei nostri esperimenti, dopo l'esposizione al freddo, l'inibizione dei neuroni dell'LH causa un acuto raffreddamento del corpo, ma questo raffreddamento viene antagonizzato probabilmente dall'attivazione di sistemi funzionalmente vicarianti. Oltretutto, l'effetto compensatorio è di lunga durata, dato che la temperatura cerebrale risulta significativamente maggiore se raffrontata a quella del controllo nel resto del giorno sperimentale. L'esistenza di uno o di molteplici sistemi compensatori che possono vicariare la funzione dell'ipocretina non è sorprendente dato che gli animali con un deficit cronico di ipocretina sono capaci di mantenere la loro temperatura corporea durante l'esposizione al freddo (Takahashi et al., 2013). È interessante notare che, topi senza neuroni ipocretinergici sono molto più suscettibili all'ipotermia durante

l'esposizione al freddo rispetto agli animali che mancano solo del peptide (Takahashi et al., 2013).

L'attivazione termogenetica compensatoria produce anche un interessante disaccoppiamento tra lo stato comportamentale e l'attività autonoma. Infatti, durante questo periodo, l'aumento del tono autonomo (presumibilmente simpatico), mirato al recupero fisiologico della temperatura corporea, avviene mentre la quantità di sonno NREM è ancora alta. Questa associazione sembra essere inusuale dato che l'attivazione della termogenesi comunemente promuove la veglia (Cerri et al., 2005), mentre il sonno NREM è generalmente accompagnato da una diminuzione nell'attività simpatica, specialmente del tono termogenico (Alfoldi et al., 1990). Il fatto che nel presente esperimento, a dispetto di un aumento del tono termogenico, la propensione alla veglia non sia stata aumentata, suggerisce che i neuroni LH (probabilmente neuroni ipocretinergici) abbiano un ruolo chiave nell'accoppiamento autonomo-comportamentale.

Alla temperatura ambientale di 24 °C non si è osservata una diminuzione della temperatura cerebrale, suggerendo che i neuroni LH non giocano un ruolo nel mantenimento di base della temperatura corporea. Inaspettatamente, è stato osservato un aumento della temperatura cerebrale durante l'iniezione di salina. Questo può essere spiegato tramite la procedura di iniezioni ripetute che, nonostante gli sforzi da parte degli sperimentatori, potrebbe aver prodotto una lieve stress nell'animale. Una spiegazione alternativa potrebbe essere che i neuroni ipocretinergici siano attivati da una diminuzione del pH (Williams et al., 2007). Anche se il volume delle iniezioni di soluzione salina è stato molto piccolo, la possibilità che una transiente riduzione nel pH extracellulare potrebbe aver indotto un'attivazione dei neuroni ipocretinergici non può essere esclusa, ma appare improbabile. È degno di nota che, qualunque sia la

spiegazione per l'aumento nella temperatura cerebrale indotta dalla soluzione salina, l'iniezione di muscimolo l'abolisce. Seguendo la stessa linea di pensiero, la differenza significativa nella frequenza cardiaca che si osserva tra le iniezioni di muscimolo e di veicolo potrebbe essere causata da una tachicardia indotta dall'iniezione di soluzione salina piuttosto che da una bradicardia indotta dall'iniezione di muscimolo.

La limitazione maggiore di questo studio è la mancanza di selettività per le specie neuronali che sono interessate dalle microiniezioni di muscimolo nell'LH. Se questo da un lato non ci permette di definire con precisione quale sia l'esatto substrato neuronale responsabile degli effetti osservati, dall'altro lato potrebbe dare maggiori informazioni sulle funzioni complessive esplicate da quest'area, riempiendo il vuoto di altri approcci sperimentali: i) mentre il silenziamento dei neuroni ipocretinergici per via optogenetica è stato condotto solo per un limitato periodo di tempo (1 ora), i nostri dati producono informazioni sugli effetti di una acuta e prolungata (6 ore) inibizione (tra gli altri) dei neuroni ipocretinergici; ii) l'antagonismo farmacologico dei due recettori ipocretinergici ha effetto per un esteso periodo di tempo, ma non produce alcuna informazione sul ruolo nei neuroni ipocretinergici, dato questi che esprimono molti altri neurotrasmettitori come il glutammato (Abrahamson et al., 2001; Rosin et al., 2003; Torrealba et al., 2003), dinorfina (Chou et al., 2001), galanina (Hakansson et al., 1999), e ossido nitrico (Cheng et al., 2003). In particolare alcune disfunzioni termoregatorie sono state collegate alla mancanza di neuroni ipocretinergici piuttosto che alla mancanza del neuropeptide ipocretina (Zhang et al., 2010; Takahashi et al., 2013); iii) l'ablazione genetica dell'ipocretina (Chemelli et al., 1999), dei recettori ipocretinergici (Lin et al., 1999), o dei neuroni ipocretinergici (Hara et al., 2001), non produce informazioni sull'effetto acuto prodotto dalla mancanza di ipocretina; iv) all'interno

dell'LH ci sono altri neuroni correlati al sonno che non sono né ipocretinergici né MCHergici (Hassani et al., 2010)

In conclusione i risultati di questo primo esperimento mostrano che l'inibizione acuta dei neuroni all'interno dell'LH produce un massivo aumento nella componente E-SWA del sonno NREM, una consistente diminuzione della quantità di veglia, una soppressione delle fasi di transizione tra sonno NREM e sonno REM e una conseguente inibizione della comparsa del sonno REM. Inoltre, i nostri dati indicano che i neuroni localizzati nell'LH sono coinvolti nella risposta primaria di difesa dal freddo e che questi neuroni o subpopolazioni neuronali all'interno dell'LH giocano un ruolo fondamentale nell'accoppiamento tra comportamento ed attività autonoma.

In seguito ai risultati ottenuti in questo primo studio, abbiamo quindi esplorato il ruolo svolto dall'ipocretina nel modulare la risposta termoregolatoria, agendo in un'area chiave della regolazione di questa funzione come la RVMM e valutando altresì se e come questa modificasse il comportamento dell'animale.

I dati osservati dopo microiniezione di ipocretina nel RVMM mostrano effetti sia autonomici che comportamentali. Dal punto di vista autonomico, abbiamo osservato sia effetti termoregolatori che cardiovascolari.

Dal punto di vista termoregatorio, è stato suggerito, sulla base di esperimenti condotti nel ratto anestetizzato, che l'ipocretina abbia un ruolo di amplificazione dell'attività termogenica guidata dai neuroni del RVMM (Tupone et al., 2011). Secondo questa ipotesi, l'ipocretina di per sé avrebbe poco effetto in presenza di un ridotto tono eccitatorio diretto ai neuroni dell'RVMM mentre sarebbe molto più efficace in condizioni nelle quali l'organismo è già impegnato ad attivare una risposta termogenica. I nostri dati, ottenuti su animali liberi di muoversi e non anestetizzati, confermano questa ipotesi. Infatti l'aumento di temperatura centrale che abbiamo osservato è netto a

10°C, modesto a 24°C e praticamente nullo a 32°C. Questi dati suggeriscono che l'ipocretina da sola non sia in effetti in grado di innescare una risposta termogenica efficace dai neuroni del RVMM se non in presenza di altri neurotrasmettitori eccitatori, o, alternativamente, in presenza di un elevato tono inibitorio.

Anche la funzione cardiovascolare è influenzata dalla presenza di ipocretina nel RVMM, specialmente per quanto riguarda la PAM. A 24°C abbiamo osservato un significativo incremento della PAM che non viene però replicato a 32°C o a 10°C. A 32°C, la mancanza dell'effetto può essere attribuita alla mancanza di tono eccitatorio o all'aumentato tono inibitorio sui neuroni del RVMM causato dall'esposizione ad elevata temperatura ambientale. L'esposizione a 10°C causa invece un'elevazione della PAM. È possibile che i livelli più alti di PAM impediscano di vedere un ulteriore incremento di pressione. In quest'ottica gli effetti pressori evocati dall'ipocretina non produrrebbero incrementi para-fisiologici ma riprodurrebbero l'elevazione pressoria osservata in condizioni fisiologiche di attivazione comportamentale.

Molto minori sono risultati gli effetti a carico della FC. Questo dato è interessante, in quanto i neuroni del RVMM sono invece noti per poter esercitare un'importante effetto sulla FC (Cerri and Morrison, 2005). E' possibile che la popolazione di neuroni su cui agisce l'ipocretina nell'RVMM non sia quindi la stessa che viene attivata in seguito a diverse stimolazioni farmacologiche di questi neuroni. Per esempio, la somministrazione nell'RVMM dell'antagonista dei recettori GABA_A bicucullina (Cao WH and Morrison SF, 2003) produce un massivo incremento di FC, come per altro la somministrazione di NMDA (Tupone et al., 2011). Anche l'attivazione della termogenesi evocata da centri superiori, come per esempio la somministrazione dell'antagonista dei recettori GABA_A bicucullina nel DMH (Samuels et al., 2004; Zaretskaia et al., 2008), produce incrementi importanti di FC mediati dal RVMM. Le

stimolazioni farmacologiche appena descritte, benché specifiche per un tipo recettoriale, sono sicuramente in grado di agire su diverse popolazioni neuronali, essendo i recettori GABA_A e NMDA molto comuni. La ridotta efficacia dell'ipocretina nel provocare un aumento della FC ci farebbe quindi supporre che l'ipocretina stessa possa agire su una sottopopolazione specifica di neuroni nel RVMM. In particolare, la popolazione di neuroni serotoninergici nell'RVMM potrebbe essere un ottimo candidato bersaglio per l'azione dell'ipocretina. Questi neuroni serotoninergici non sono infatti tonicamente attivi (Corradetti R. et al., 1996), non essendo stati descritti effetti in seguito alla somministrazione nell'RVMM dell'antagonista dei recettori 5-HT_{1A} WAY 100635, e sono già stati identificati come gli unici della zona a possedere recettori per un'importante pirogeno come la PGE₂ (Nakamura K et al., 2000). Su queste basi, si potrebbe ipotizzare che l'effetto evocato dall'ipocretina nell'RVMM differisca da quanto osservato in seguito ad attivazioni di più sottogruppi neuronali della zona. Un'analisi immunoistochimica permetterebbe di verificare se i neuroni serotoninergici dell'area siano gli unici ad esprimere recettori per l'ipocretina e ad essere attivati in seguito alla sua somministrazione.

Dal punto di vista comportamentale, la somministrazione di ipocretina nell'RVMM produce un incremento importante della quantità di veglia. Tale incremento è stato massiccio a 24°C e a 10°C e modesto a 32°C. Questo dato è stato inaspettato, in quanto le popolazioni neuronali dell'RVMM sono principalmente efferenti, e quindi non direttamente in grado di modificare lo stato di attivazione corticale. Un'eccezione a questa osservazione è data dalla popolazione di neuroni ON e OFF presenti nell'area e coinvolti nella percezione del dolore (Fay R.M. et al., 1990). Questi neuroni faciliterebbero la trasmissione della sensazione dolorifica quando attivati, mentre verrebbero inibiti dai sistemi antinocicettivi. È quindi possibile che l'attivazione

corticale osservata nel nostro esperimento possa essere causata dall'attivazione di questa popolazione neuronale, anche se questa ipotesi appare debole alla luce di alcune considerazioni. Per esempio, per quale motivo la liberazione di ipocretina, che avviene in coincidenza con comportamenti motivati da parte dell'animale, dovrebbe aumentare la percezione del dolore. Se questo fosse il caso, qualunque condizione di attivazione e di espressione di comportamenti motivati, come il mangiare per esempio, sarebbe accompagnata da dolore. Un'ipotesi alternativa potrebbe essere proposta ipotizzando che l'attivazione autonoma periferica venga ritrasmessa ai centri integratori ipotalamici responsabili della determinazione dello stato di vigilanza, come riflesso neuro-vegetativo. In questo caso, l'attivazione stessa del sistema nervoso simpatico porterebbe con sé l'attivazione corticale come conseguenza necessaria. Questa osservazione fa però sorgere domande interessanti relative alla funzione dei neuroni ipocretinergici dell'LH: sono essi una popolazione omogenea o differiscono in funzione delle aree a cui proiettano? Se infatti l'attivazione dell'efferenza ipocretinergica all'RVMM è sufficiente ad attivare la corteccia, qual è il ruolo delle proiezioni corticali dei neuroni ipocretinergici? Ulteriori esperimenti sono necessari per districare il controllo dello stato comportamentale dal controllo del necessario supporto autonomico.

In conclusione, questo secondo esperimento ha mostrato che l'attivazione autonoma da parte dell'ipocretina dei neuroni dell'RVMM è sufficiente a produrre un'attivazione corticale e dello stato comportamentale e suggerisce che l'effetto autonomico indotto possa essere mediato da una sottopopolazione specifica dei neuroni dell'RVMM.

CONCLUSIONI

Gli esperimenti presentati evidenziano il ruolo chiave che i neuroni dell'ipotalamo laterale svolgono nel coordinare l'attività autonoma con lo stato comportamentale. L'induzione di uno stato di sonno NREM caratterizzato da un'elevata potenza Delta, dall'assenza di sonno REM e dall'assenza totale di ogni transizione di stato in seguito ad inibizione dei neuroni in quest'area suggerisce che questa regione svolga un ruolo essenziale nell'innescare episodi di veglia sostenuti e di sonno REM.

I substrati neurali responsabili di tali regolazione sono probabilmente diversi. Da un lato l'inibizione acuta dell'attività dei neuroni ipocretinergici sembra ridurre la capacità dell'SNC di innescare stati di veglia sostenuta, mentre l'inibizione dei neuroni MCH potrebbe essere responsabile dell'inibizione della comparsa di sonno REM. Gli effetti riscontrati dopo inibizione dell'intero LH sono però più netti rispetto a quanto osservato dopo inibizione selettiva dell'attività dei neuroni ipocretinergici o dei neuroni LH, suggerendo che altre popolazioni neurali della zona giochino un ruolo nella complessa regolazione dell'alternanza degli stati comportamentali.

L'attivazione dei neuroni dell'ipotalamo laterale sembra poi rappresentare una modalità di pronta risposta a sfide ambientali che richiedano l'attivazione della termogenesi. La loro inibizione a bassa temperatura ambientale produce una modesta ipotermia transitoria, che viene compensata mentre l'inibizione dello stesso substrato neurale perdura. Questo fa pensare che la mancata entrata in funzione del meccanismo di pronto intervento termoregatorio stimoli l'attivazione di aree vicarianti, che possano supplire alla sua inattivazione e riportare la temperatura centrale entro ranghi fisiologici. L'attivazione di tale meccanismi sembra poi perdurare più a lungo nel tempo, mantenendosi la temperatura elevata per il resto della giornata sperimentale. È inoltre interessante notare che durante il recupero della normotermia, gli animali si trovano ancora ad esprimere alte quantità di sonno NREM, una condizione

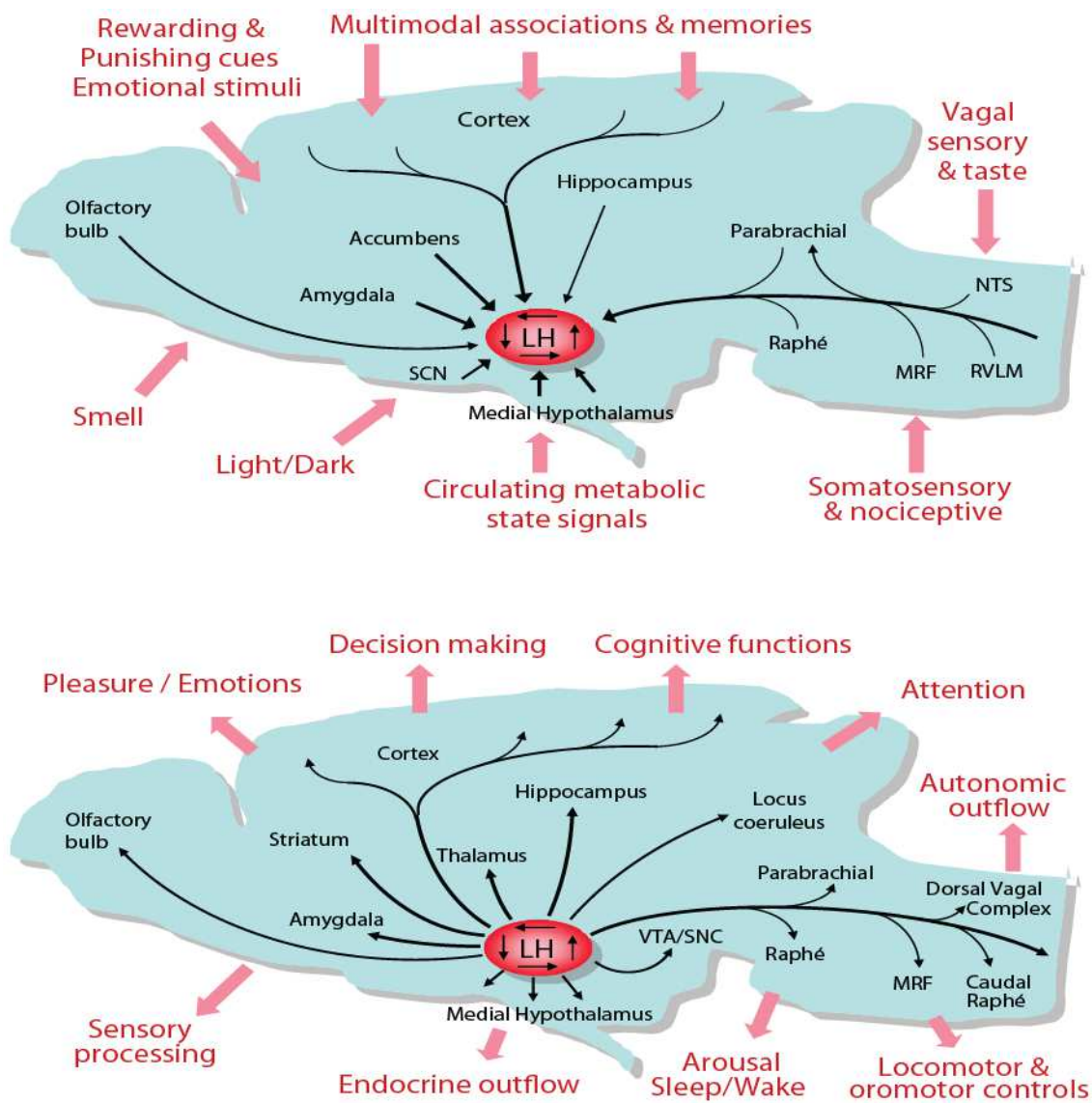
normalmente associata con una termolisi, a riprova che l'associazione fra stato comportamentale e attivazione autonoma di supporto richieda l'integrità della rete neuronale intra-ipotalamo laterale.

Al fine di valutare il ruolo autonomo termoregolatorio dell'ipocretina, una popolazione chiave dell'ipotalamo laterale, abbiamo quindi valutato il suo effetto in seguito a microiniezione nel RVMM, un relay essenziale per l'attivazione degli organi termogenici. Questo secondo esperimento ha evidenziato come l'ipocretina di per sé non sia in grado di produrre attivazione sostenuta dell'attività termoregolatoria senza la presenza di un precedente tono eccitatorio attivo sui neuroni dell'RVMM. In questo caso inoltre, l'attivazione autonoma è stata accompagnata da un'attivazione comportamentale, inaspettata se prese in considerazione le proiezioni dell'RVMM, per lo più efferenti. E' possibile interpretare questo effetto come la risultante di un riflesso neuro vegetativo, nel quale l'attivazione autonoma periferica verrebbe percepita dal SNC e causerebbe un'attivazione comportamentale. Questa interpretazione solleva comunque interessanti domande sul ruolo delle altre proiezioni dei neuroni ipocretinergici, per esempio quelle corticali, e sulla loro effettiva necessità nel modulare l'alternanza degli stati comportamentali.

In conclusione, l'Ipotalamo Laterale si rivela un'area ad elevata complessità che si manifesta nella capacità di regolare ed integrare attività autonoma e stato comportamentale in una modalità che non è semplicemente spiegabile come la somma delle attività delle sue singole popolazioni neuronali.

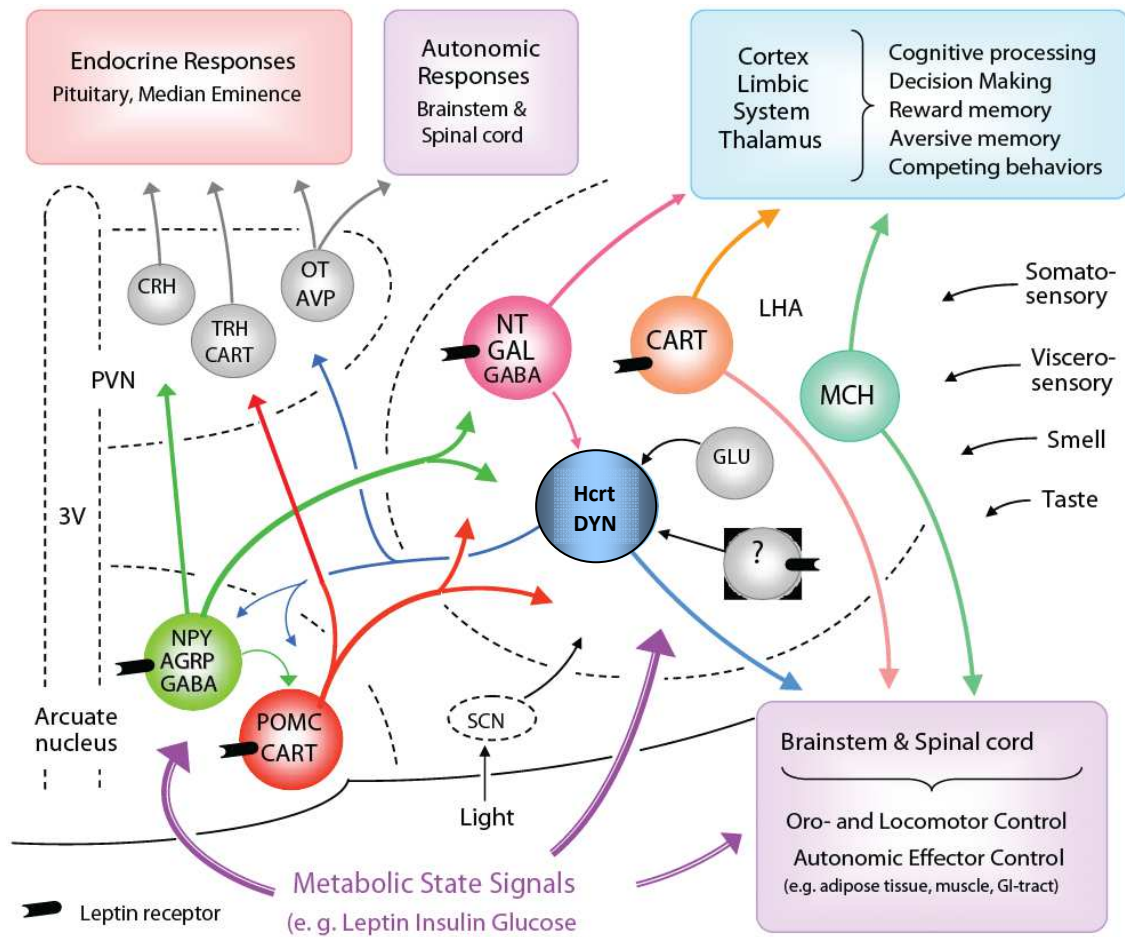
FIGURE

Figura 1. Le figure mostrano schematicamente le principali proiezioni provenienti da diverse zone dell'encefalo e dirette all'ipotalamo laterale (in alto) e le proiezioni che viceversa partono dall'ipotalamo laterale (in basso) e che sono dirette a tutto il nevrasse.



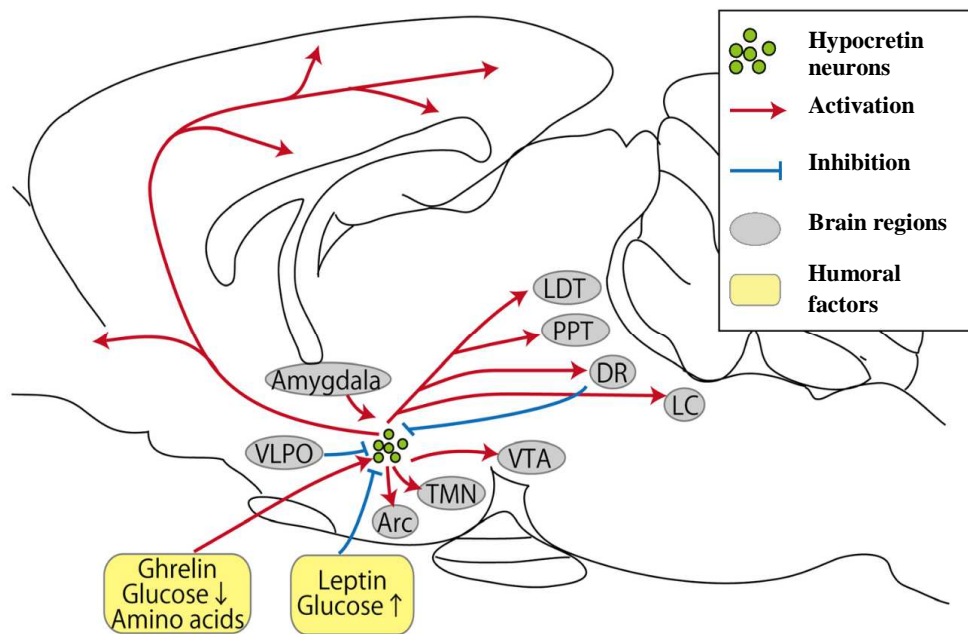
Berthoud and Munzberg, Physiol Behav. 2011; 104(1): 29-39

Figura 2. La figura mostra le interazioni dei neuroni dell'ipotalamo laterale con altre aree ipotalamiche e le più importanti proiezioni e funzioni comportamentali, autonome ed endocrine di dette aree. La figura, altamente schematica, non mostra la relazione con altri nuclei ipotalamici come i nuclei dorsomediali e ventrali. Inoltre non mostra l'intensa reciproca connessione che dalla corteccia e dalle strutture limbiche è diretta all'ipotalamo laterale. Le frecce che entrano nei tre nuclei, ma che non contattano singoli neuroni, indicano potenziali proiezioni a tutti i differenti neuroni presenti in quell'area. Abbreviazioni: AgRP, peptide correlato alla proteina agouti; AVP, arginina-vasopressina; CART, trascritto regolato dalla cocaina ed dall'anfetamina; CRH, ormone di rilascio della corticotropina; DYN, dinorfina; GABA, acido gamma-aminobutirrico; Gal, galanina; Glu, glutammato; MCH, ormone concentrante la melatonina, NPY, neuropeptide Y; Gal, galanina; Glu, glutammato; MCH, ormone concentrante la melatonina, NPY, neuropeptide Y; NT, neurotensina; Hcrt, ipocretina; OT, ossitocina; POMC, proopio-melanocortina; TRH, ormone di rilascio della tireotropina; LHA, area dell'ipotalamo laterale; PVN, nucleo paraventricolare dell'ipotalamo; SNC, nucleo soprachiasmatico; 3V, terzo ventricolo.



Berthoud and Munzberg, *Physiol Behav.* 2011; 104(1): 29-39

Figura 3. La figura mostra schematicamente che i neuroni ipocretinergici inviano e ricevono numerose proiezioni da tutto il neurasse. Le frecce rosse mostrano le proiezioni eccitatorie, mentre le linee blu mostrano le proiezioni inibitorie. Abbreviazioni: Arc, nucleo arcuato; DR, nucleo del raphe dorsale; LC, locus coeruleus; LTD, nucleo tegmentale laterodorsale; PPT, nucleo tegmentale peduncolopontino; TMN, nucleo tuberomammillare; VTA, area ventrale tegmentale; VLPO, nucleo preottico ventrolaterale.



Inutsuka and Yamanaka, Frontiers in Endocrinology, 2013; Review article n. 18, volume 4.

Figura 4. La figura mostra, in corrispondenza della zampa destra, il punto di accesso chirurgico all'arteria femorale ed il catetere per la registrazione della pressione arteriosa in essa inserito. La freccia indica il trasmettitore telemetrico che viene alloggiato sotto cute.

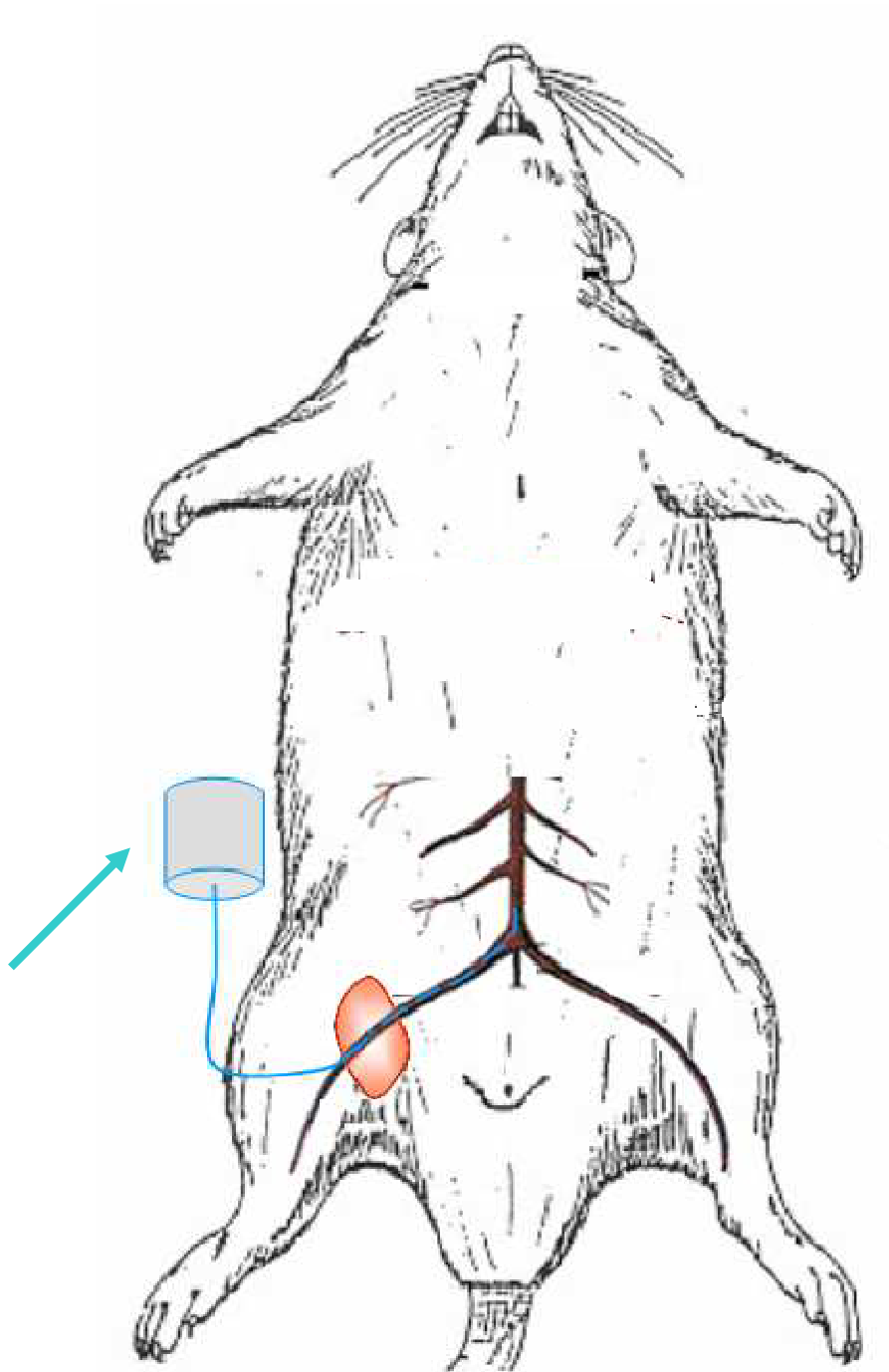
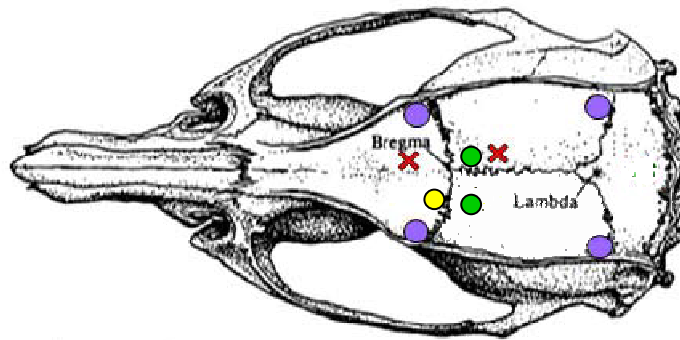


Figura 5. Le figure **a** e **b**, mostrano il cranio del ratto con una visione dorsale che mostra i punti in cui sono state effettuate le craniotomie durante l'intervento chirurgico sull'animale in anestesia generale.

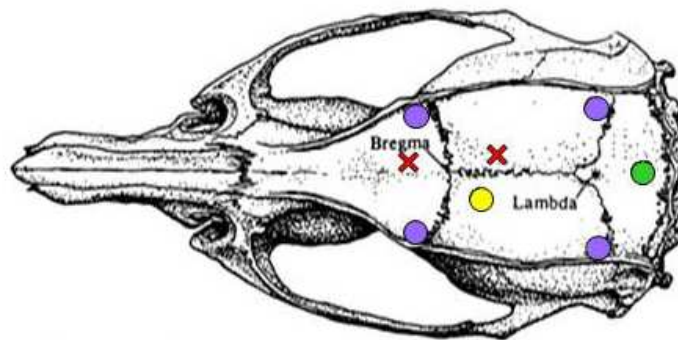
Entrambe le figure mostrano le 4 viti (viola) per l'ancoraggio dell'impianto, due nella porzione antero-laterale delle ossa frontali, due nella porzione postero-laterale delle ossa parietali; 2 elettrodi per la rilevazione del segnale elettroencefalografico (EEG; croce), uno a +3.00 mm antero-posteriore dal bregma e +3.00 mm laterale, una nell'osso parietale a -4.00 mm dal bregma e 1.00 mm laterale; 1 termistore (giallo) per la rilevazione della temperatura ipotalamica a -1.00 mm dal bregma e 1.00 mm laterale.

La figura A mostra 2 cannule (verdi) in corrispondenza della regione dell'ipotalamo laterale alle seguenti coordinate: AnteroPosteriore (AP) -2.5; LateroLaterale (LL) +/- 1.8; DorsoVentrare (DV) -8.2), per l'inserimento di due cannule guida per effettuare microiniezioni bilaterali nell'ipotalamo laterale (Esperimento A)

La figura B mostra 1 cannula (verde) in corrispondenza della regione RVMM a - 2,5/- 3.00 mm dal lambda, 0 mm laterale e -9.00/-9.5 mm in senso dorso-ventrale dalla superficie del cervelletto per l'inserimento di una cannula guida per effettuare microiniezioni nell'RVMM (Esperimento B).



a



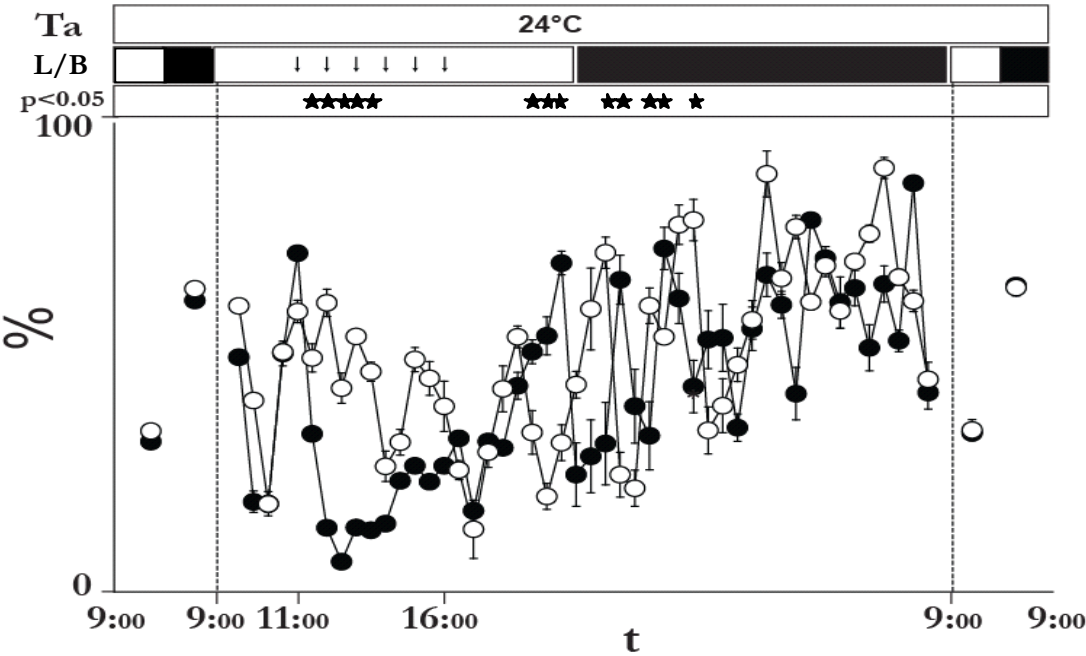
b

Figura 6. La figura mostra la quantità del tempo trascorso in veglia (espressa come percentuale di ogni intervallo temporale) durante i sei giorni sperimentali (i pallini neri indicano i giorni 1,2,3; i pallini bianchi indicano i giorni 4,5,6) per gli animali del gruppo 1 (mantenuti ad una temperatura ambiente (T_a) = 24°C, nel grafico a) e per gli animali del gruppo 2 (esposti ad una T_a = 10°C dalle 9:00 alle 17:00 del giorno 2, nel grafico b). Ogni animale di ogni gruppo è stato ripetutamente iniettato con l'agonista GABAergico muscimolo durante il giorno 2 (pallini neri, 100 nl, 1 mM, 1 iniezione all'ora bilaterale) e con salina durante il giorno 5 (pallini bianchi, 100 nl, 0.9%, 1 iniezione bilaterale all'ora). La risoluzione temporale è di 12 ore per il giorno 1,3,4 e 6 e di 30 minuti per il giorno 2 e 5.

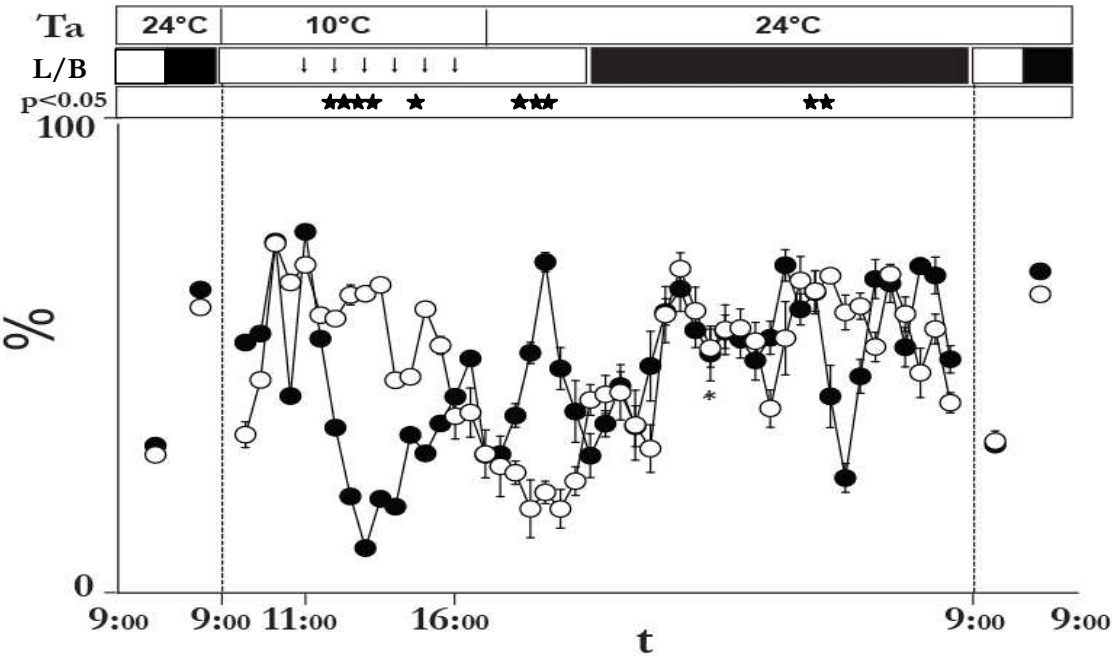
Le linee verticali tratteggiate dividono i giorni sperimentali consecutivi. La T_a , il periodo di luce (L)/buio (B) e la significatività statistica sono posizionati sopra ciascun grafico. Inoltre ciascuna freccia indica un'iniezione. I dati sono visualizzati come media \pm SEM, * = $p < 0,05$.

ESPERIMENTO A

VEGLIA - Quantità



a



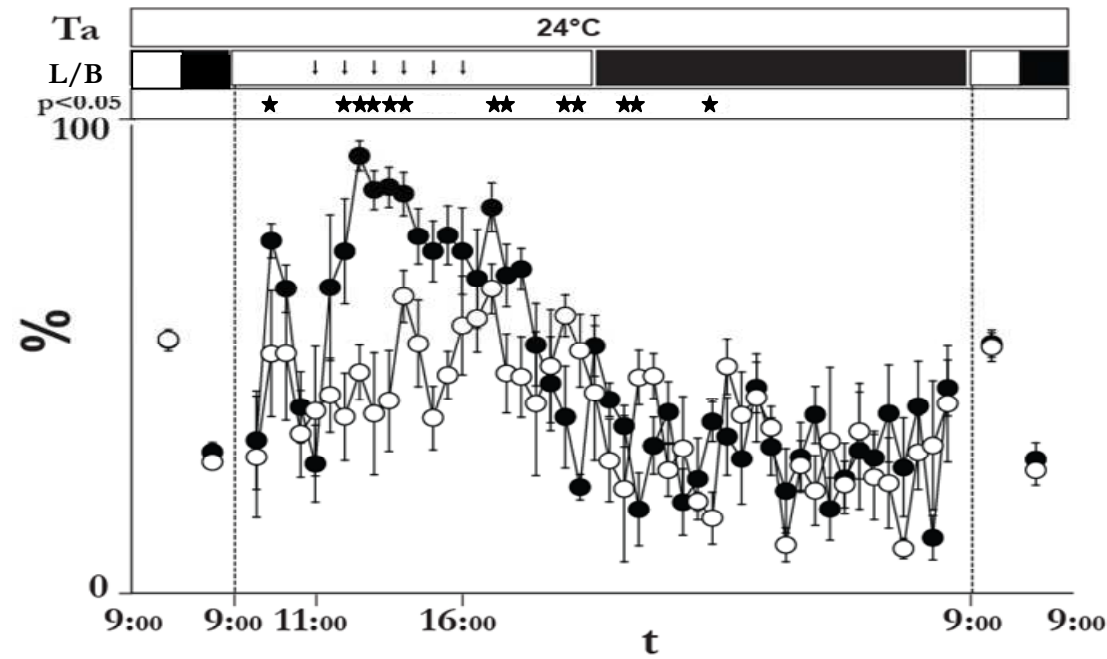
b

Figura 7. La figura mostra la quantità del tempo trascorso in sonno NREM (espressa come percentuale del tempo totale) durante i sei giorni sperimentali (i pallini neri indicano i giorni 1,2,3; i pallini bianchi indicano i giorni 4,5,6) per gli animali del gruppo 1 (mantenuti ad una temperatura ambiente (T_a) = 24°C, nel grafico a) e per gli animali del gruppo 2 (esposti ad una T_a = 10°C dalle 9:00 alle 17:00 del giorno 2, nel grafico b). Ogni animale di ogni gruppo è stato ripetutamente iniettato con l'agonista GABAergico muscimolo durante il giorno 2 (pallini neri, 100 nl, 1 mM, 1 iniezione all'ora bilaterale) e con salina durante il giorno 5 (pallini bianchi, 100 nl, 0.9%, 1 iniezione bilaterale all'ora). La risoluzione temporale è di 12 ore per il giorno 1,3,4 e 6 e di 30 minuti per il giorno 2 e 5.

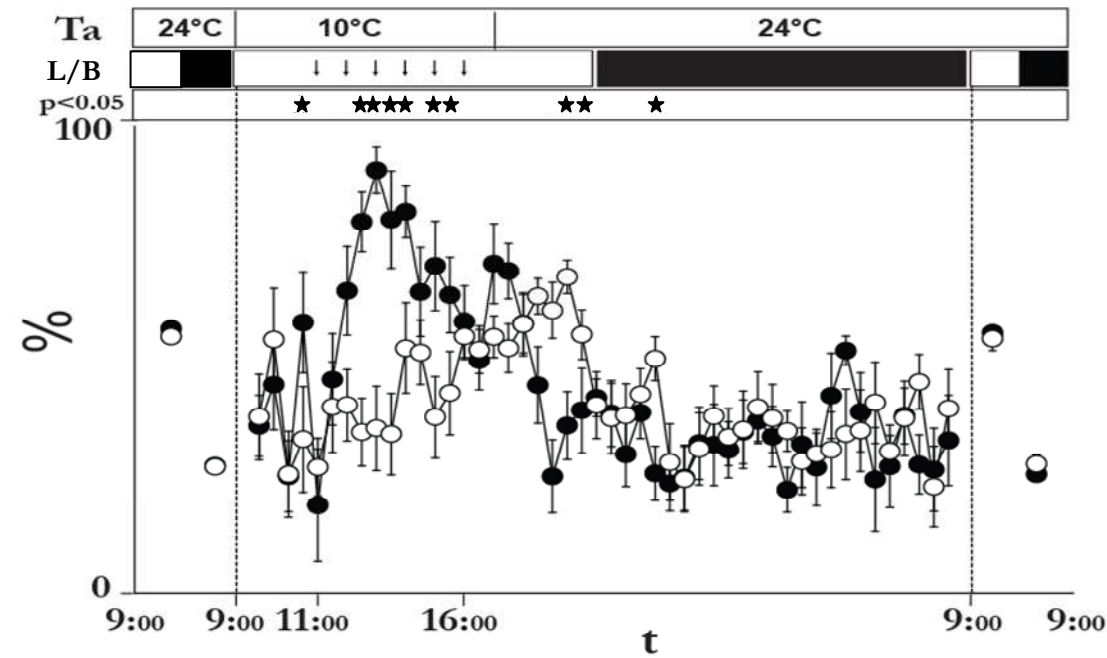
Le linee verticali tratteggiate dividono i giorni sperimentali consecutivi. La T_a , il periodo di luce (L)/buio (B) e la significatività statistica sono posizionati sopra ciascun grafico. Inoltre ciascuna freccia indica un'iniezione. I dati sono visualizzati come media \pm SEM, * = $p < 0,05$.

ESPERIMENTO A

SONNO NREM - Quantità



a



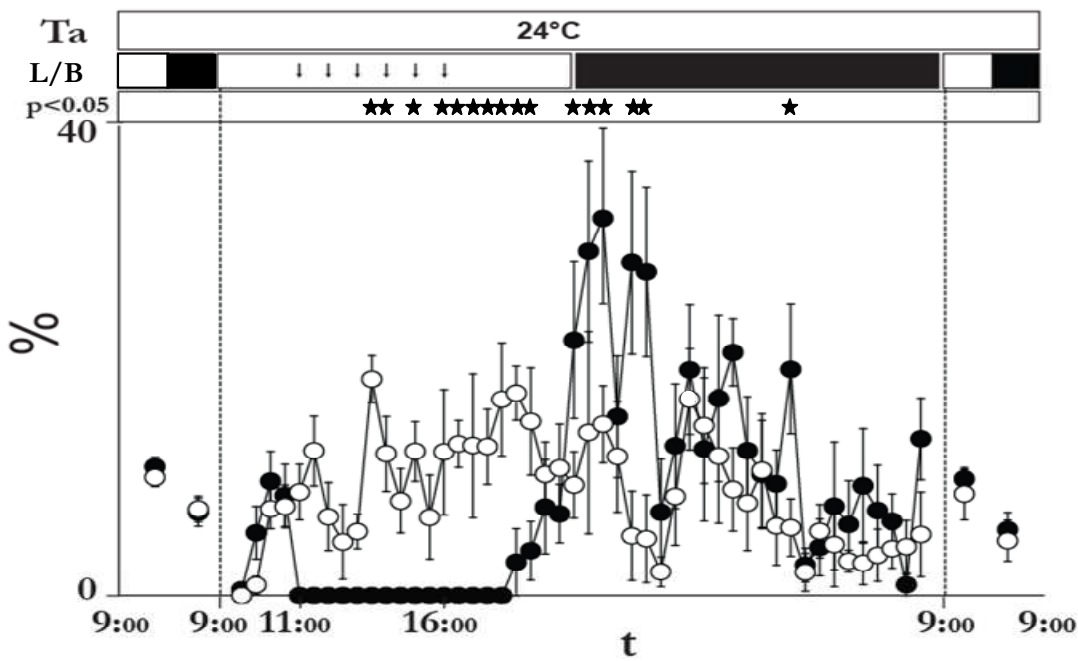
b

Figura 8. La figura mostra la quantità del tempo trascorso in sonno REM (espressa come percentuale del tempo totale) durante i sei giorni sperimentali (i pallini neri indicano i giorni 1,2,3; i pallini bianchi indicano i giorni 4,5,6) per gli animali del gruppo 1 (mantenuti ad una temperatura ambiente (T_a) = 24°C, nel grafico a) e per gli animali del gruppo 2 (esposti ad una T_a = 10°C dalle 9:00 alle 17:00 del giorno 2, nel grafico b). Ogni animale di ogni gruppo è stato ripetutamente iniettato con l'agonista GABAergico muscimolo nel giorno 2 (pallini neri, 100 nl, 1 mM, 1 iniezione all'ora bilaterale) e con salina nel giorno 5 (pallini bianchi, 100 nl, 0.9%, 1 iniezione bilaterale all'ora). La risoluzione temporale è stata di 12 ore per il giorno 1,3,4 e 6 e di 30 minuti per il giorno 2 e 5.

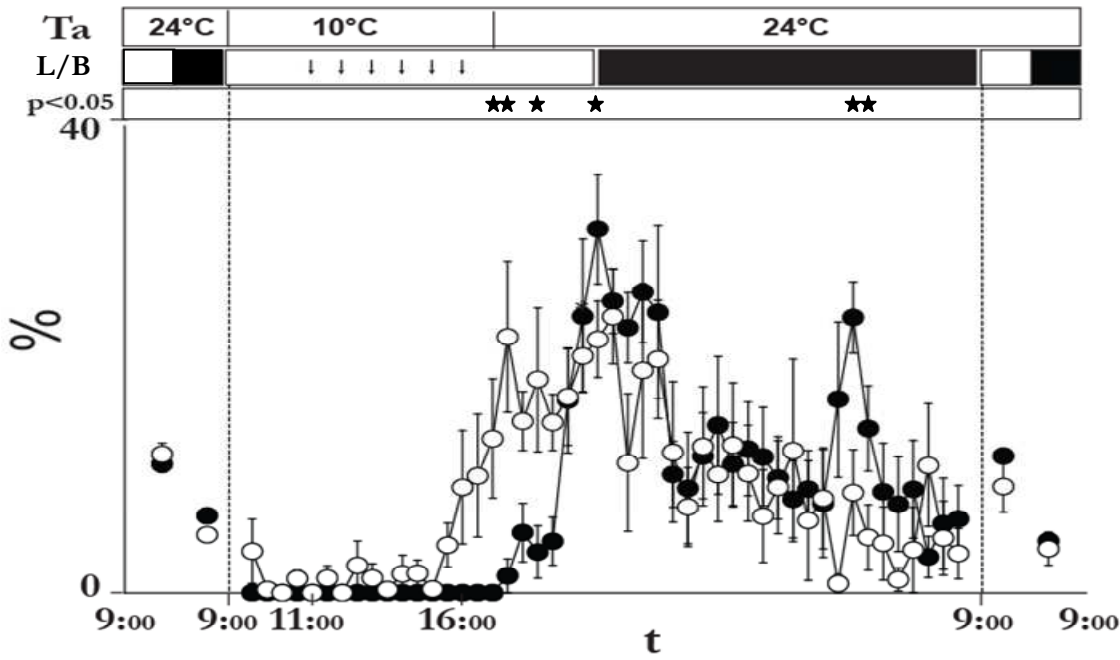
Le linee verticali tratteggiate dividono i giorni sperimentali consecutivi. La T_a , il periodo di luce (L)/buio (B) e la significatività statistica sono posizionati sopra ciascun grafico. Inoltre ciascuna freccia indica un'iniezione. I dati sono visualizzati come media \pm SEM, * = $p < 0,05$.

ESPERIMENTO A

SONNO REM - Quantità



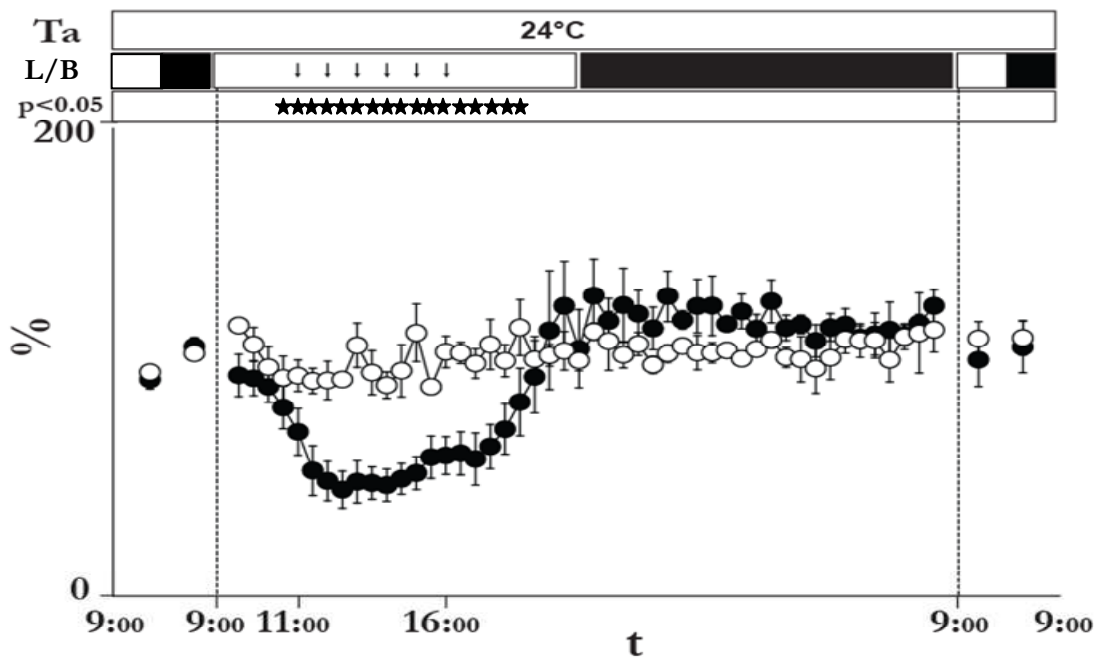
a



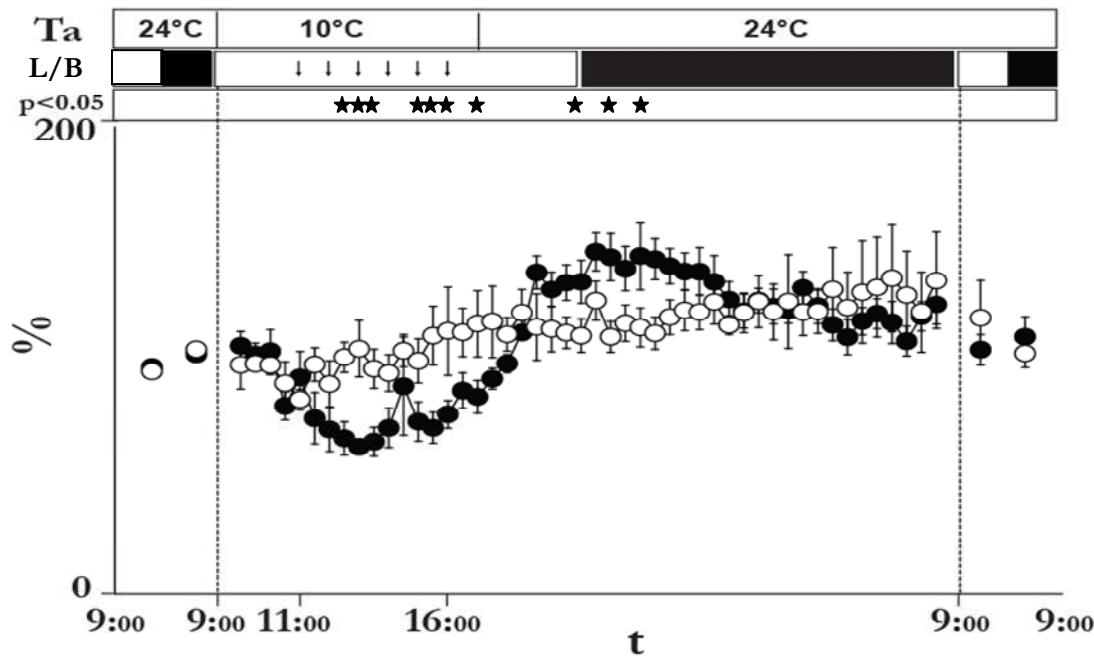
b

ESPERIMENTO A

VEGLIA - Potenza banda Theta (5,5-9,0 Hz)



a

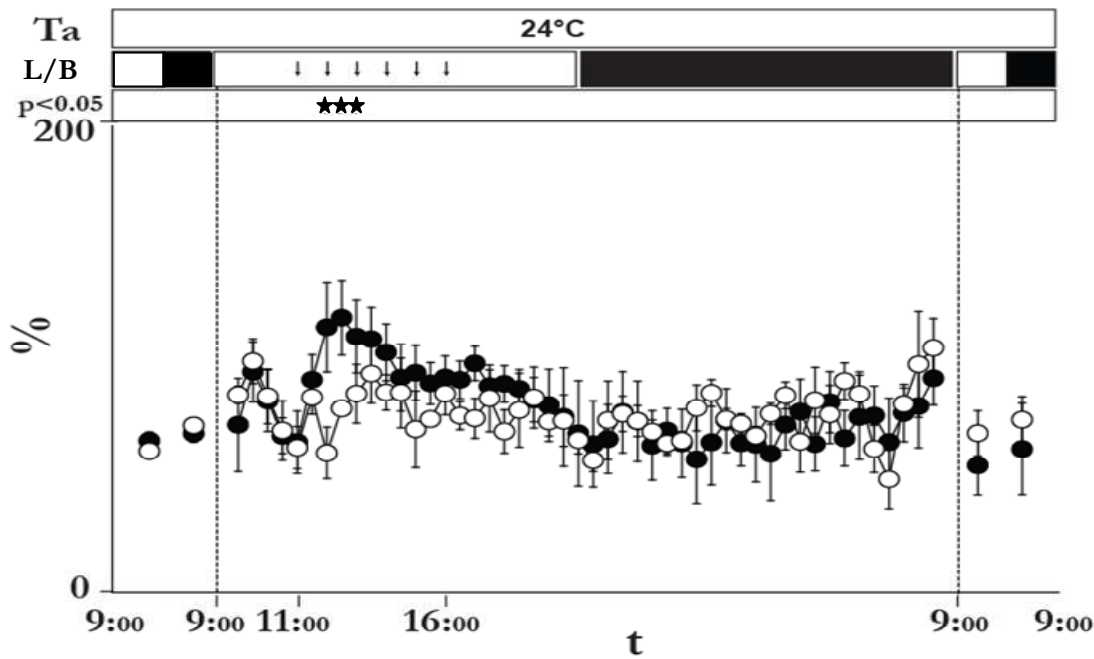


b

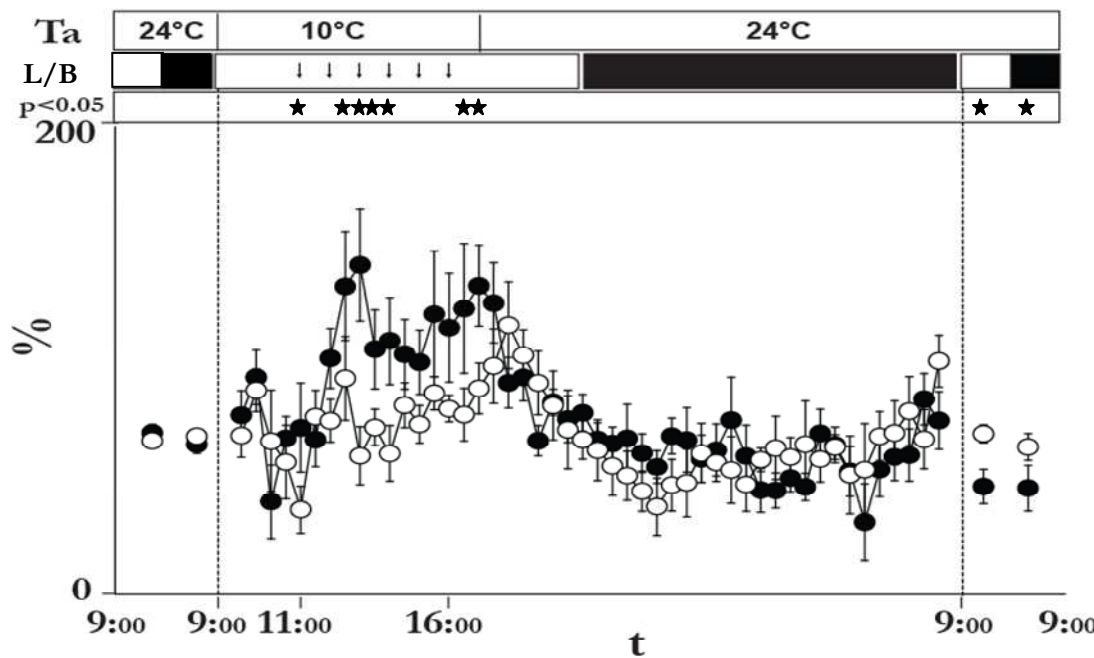
Figura 10. La figura mostra l'andamento della potenza della banda Delta (0,75-4,0 Hz) dell'EEG durante il sonno NREM nei sei giorni sperimentali per gli animali del gruppo 1 (mantenuti ad una temperatura ambiente (T_a) = 24°C, nel grafico a) e per gli animali del gruppo 2 (esposti ad una T_a = 10°C dalle 9:00 alle 17:00 del giorno 2, nel grafico b). Le potenze sono state normalizzate sulla media della potenza dell'EEG del giorno precedente quello d'iniezione ed espresse in percentuale. Ogni animale di ogni gruppo è stato ripetutamente iniettato con l'agonista GABAergico muscimolo durante il giorno 2 (pallini neri, 100 nl, 1 mM, 1 iniezione all'ora bilaterale) e con salina durante il giorno 5 (pallini bianchi, 100 nl, 0,9%, 1 iniezione bilaterale all'ora). La risoluzione temporale è stata di 12h per il giorno 1,3,4 e 6 e di 30 minuti per il giorno 2 e 5. Le linee verticali tratteggiate dividono i giorni sperimentali consecutivi. La T_a , il periodo di luce (L)/buio (B) e la significatività statistica sono posizionati sopra ciascun grafico. Inoltre ciascuna freccia indica un'iniezione. I dati sono visualizzati come media \pm SEM, * = $p < 0,05$.

ESPERIMENTO A

SONNO NREM - Potenza banda Delta (0,75-4,0Hz)



a

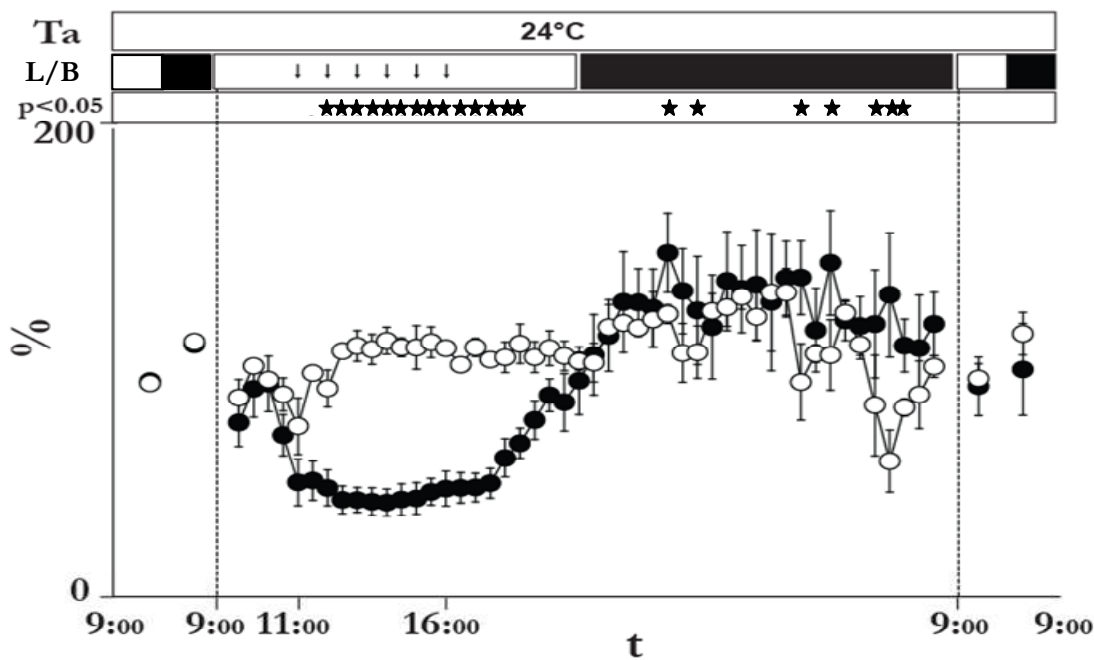


b

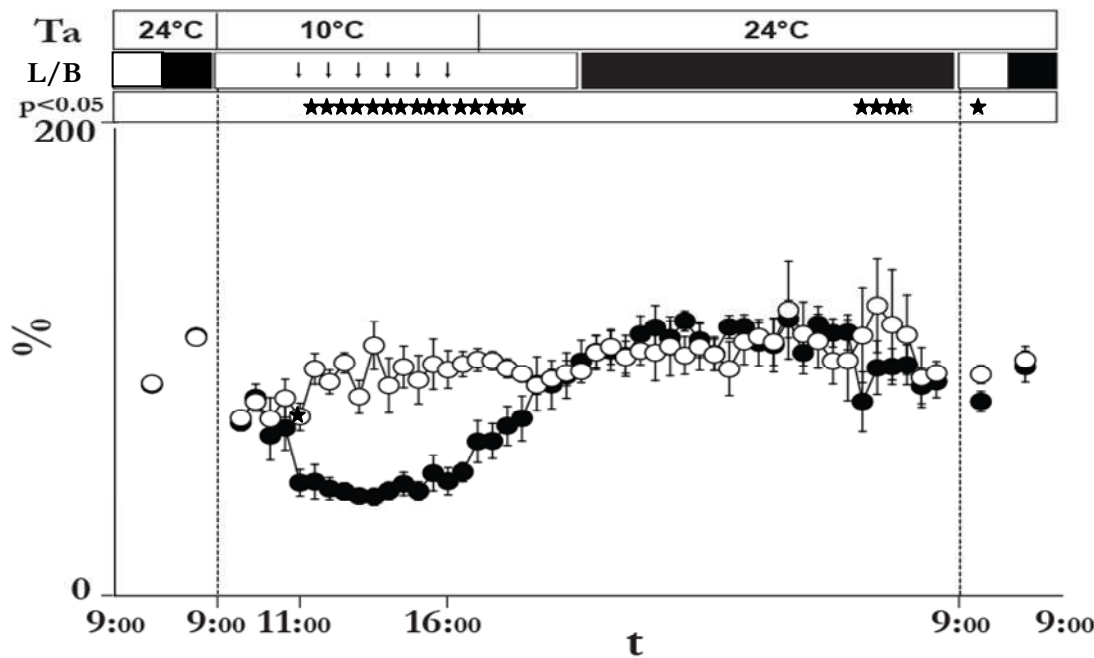
Figura 11. La figura mostra l'andamento della potenza della banda Sigma (11,0-16,0 Hz) dell'EEG durante il sonno NREM nei sei giorni sperimentali per gli animali del gruppo 1 (mantenuti ad una temperatura ambiente (T_a) = 24°C, nel grafico a) e per gli animali del gruppo 2 (esposti ad una T_a = 10°C dalle 9:00 alle 17:00 del giorno 2, nel grafico b). Le potenze sono state normalizzate sulla media della potenza dell'EEG del giorno precedente quello d'iniezione ed espresse in percentuale. Ogni animale di ogni gruppo è stato ripetutamente iniettato con l'agonista GABAergico muscimolo durante il giorno 2 (pallini neri, 100 nl, 1 mM, 1 iniezione all'ora bilaterale) e con salina durante il giorno 5 (pallini bianchi, 100 nl, 0,9%, 1 iniezione bilaterale all'ora). La risoluzione temporale è stata di 12h per il giorno 1,3,4 e 6 e di 30 minuti per il giorno 2 e 5. Le linee verticali tratteggiate dividono i giorni sperimentali consecutivi. La T_a , il periodo di luce (L)/buio (B) e la significatività statistica sono posizionati sopra ciascun grafico. Inoltre ciascuna freccia indica un'iniezione. I dati sono visualizzati come media \pm SEM, * = $p < 0,05$.

ESPERIMENTO A

SONNO NREM - Potenza banda Sigma (11,0-16,0 Hz)



a



b

Figura 12. La figura mostra l'andamento medio della potenza dell'EEG durante i giorni delle iniezioni dell'agonista dei recettori GABA_A muscimolo (100 nl, 1mM, 1 iniezione/h bilaterale) o di soluzione salina (100 nl, 0,9%, 1 iniezione/h bilaterale) per gli animali del gruppo 1 (fig. a e b) e del gruppo 2 (fig. e ed f). Le potenze sono state normalizzate sulla media della potenza dell'EEG del giorno precedente quello d'iniezione ed espresse in percentuale. La temperatura ambientale è espressa su ogni pannello. Le linee verticali indicano la finestra di tempo che intercorre dalla prima iniezione ad un'ora dopo l'ultima iniezione. Le figure c, d, g ed h mostrano l'andamento medio della potenza dell'EEG del sonno NREM (c,g) e della veglia (d,h), durante il periodo delle iniezioni.

ESPERIMENTO A

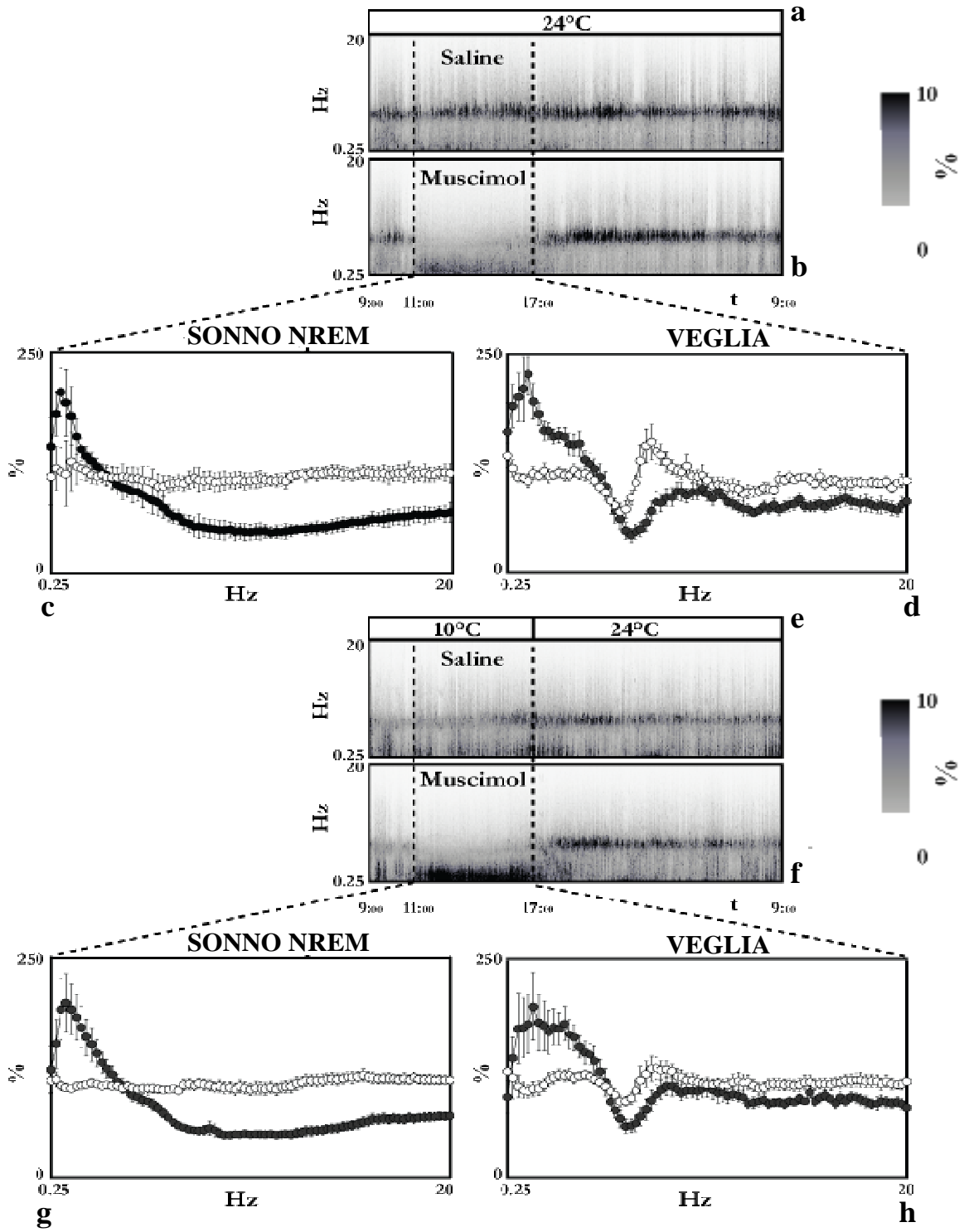
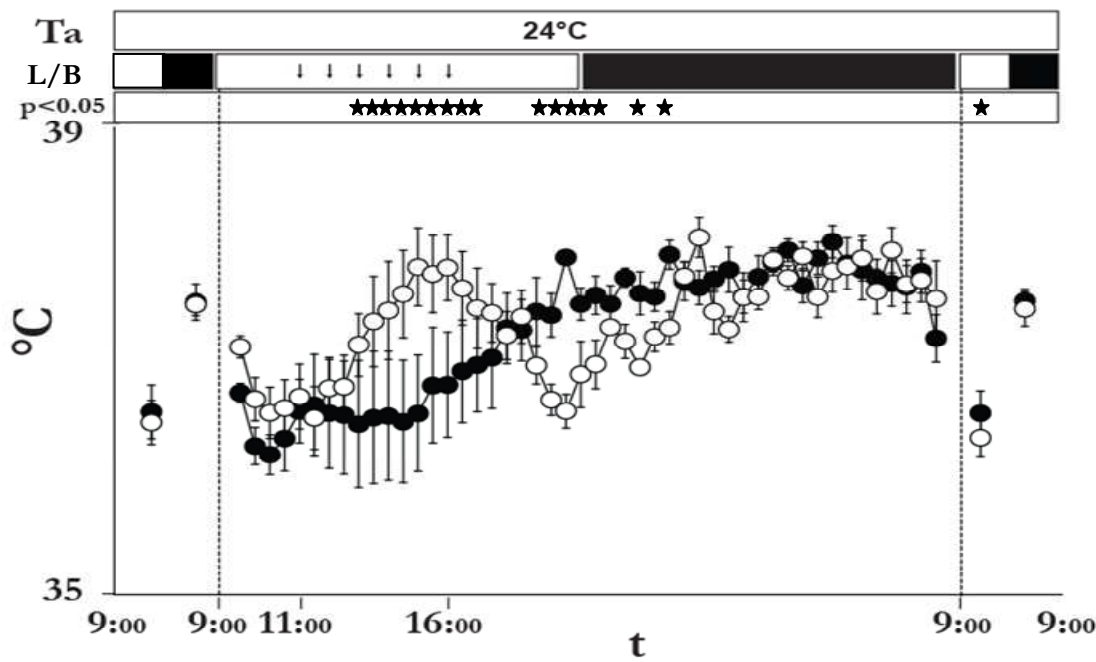


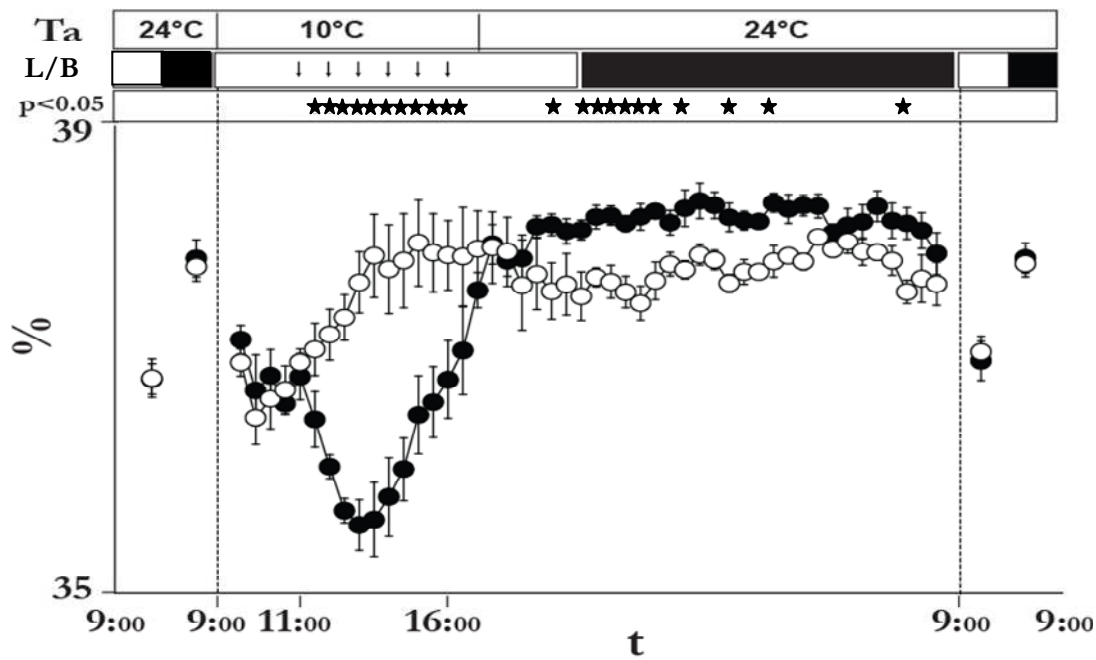
Figura 13. La figura mostra l'andamento della temperatura ipotalamica nei sei giorni sperimentali per gli animali del gruppo 1 (mantenuti ad una temperatura ambiente (T_a) = 24°C, nel grafico a) e per gli animali del gruppo 2 (esposti ad una T_a = 10°C dalle 9:00 alle 17:00 del giorno 2, nel grafico b). Ogni animale di ogni gruppo è stato ripetutamente iniettato con l'agonista GABAergico muscimolo durante il giorno 2 (pallini neri, 100 nl, 1 mM, 1 iniezione all'ora bilaterale) e con salina durante il giorno 5 (pallini bianchi, 100 nl, 0.9%, 1 iniezione bilaterale all'ora). La risoluzione temporale è stata di 12h per il giorno 1,3,4 e 6 e di 30 minuti per il giorno 2 e 5. Le linee verticali tratteggiate dividono i giorni sperimentali consecutivi. La T_a , il periodo di luce (L)/buio (B) e la significatività statistica sono posizionati sopra ciascun grafico. Inoltre ciascuna freccia indica un'iniezione. I dati sono visualizzati come media \pm SEM, * = $p < 0.05$.

ESPERIMENTO A

TEMPERATURA IPOTALAMICA



a

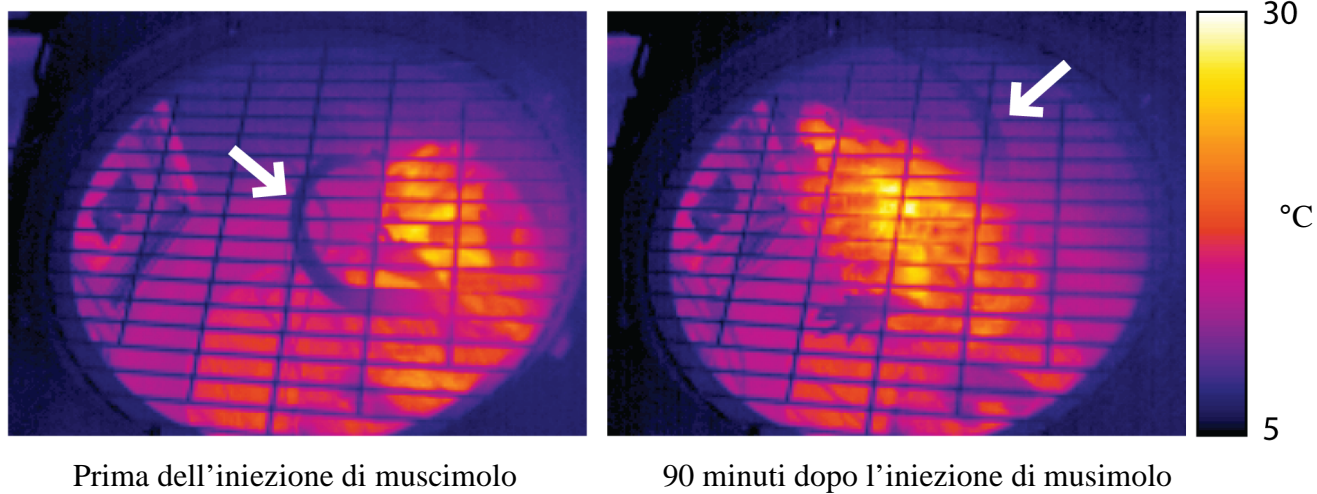


b

Figura 14. La figura mostra un esempio di un'immagine all'infrarosso (in toni di grigio e con codice di colore) dell'animale prima dell'iniezione di muscimolo nell'LH e 90 minuti dopo ($T_a = 10^\circ\text{C}$). La freccia bianca indica la coda (organo scambiatore di calore).

ESPERIMENTO A

Temperatura Cutanea



Temperatura Cutanea

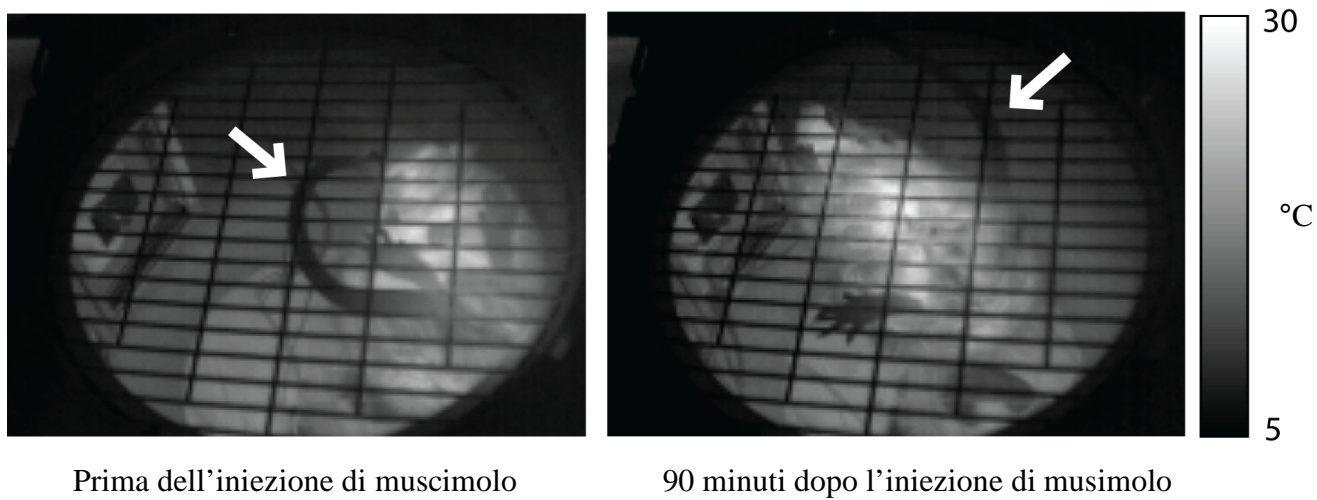
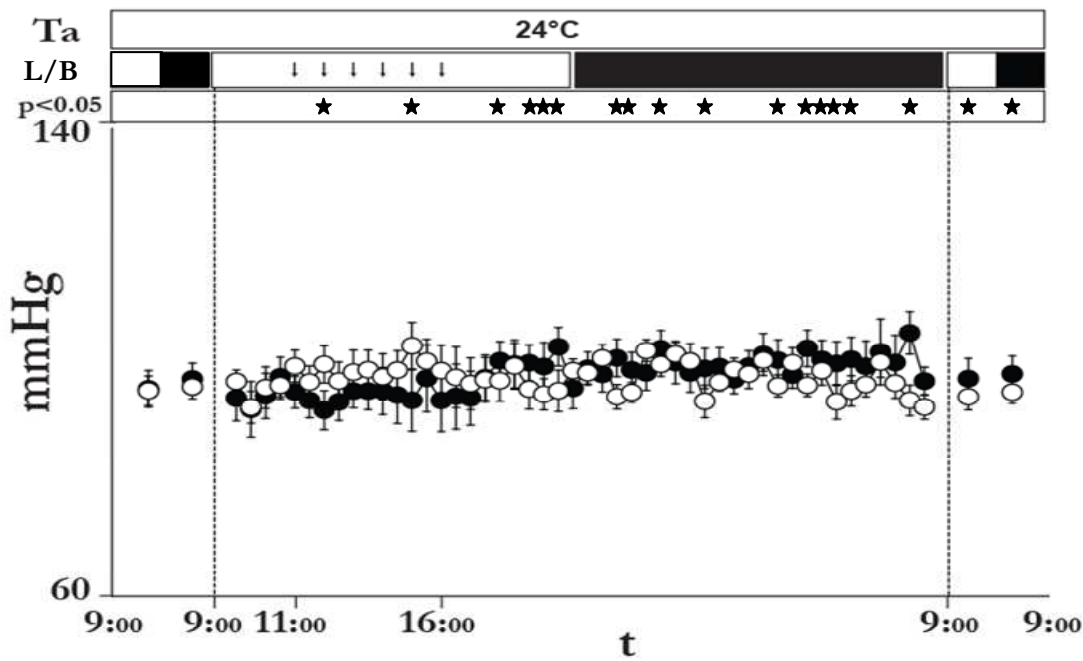


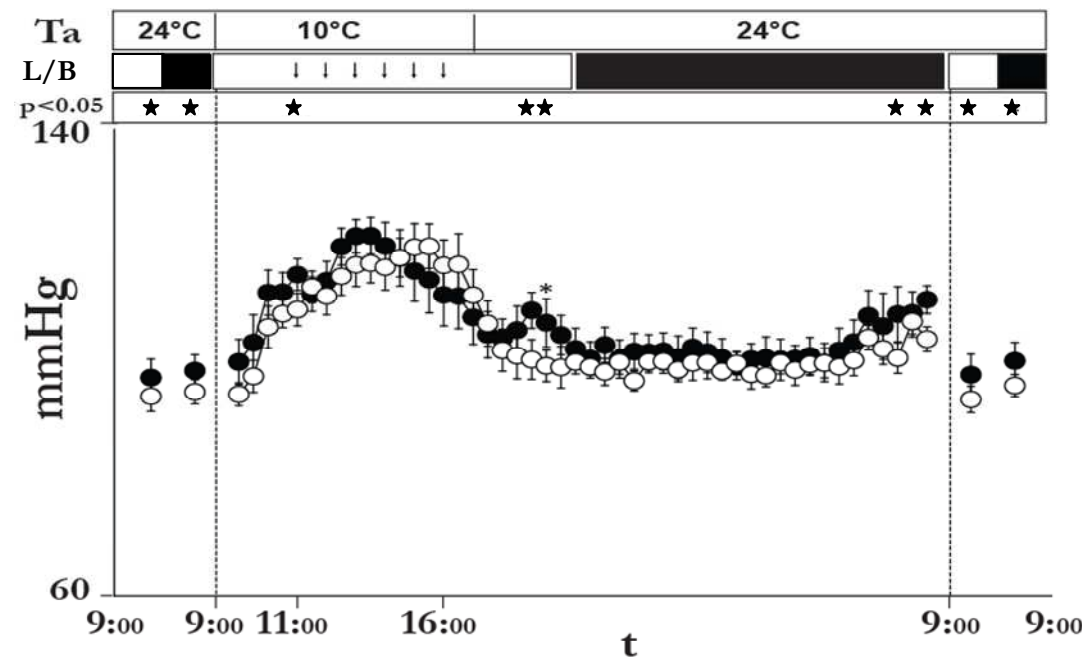
Figura 15. La figura mostra l'andamento della pressione arteriosa media nei sei giorni sperimentali per gli animali del gruppo 1 (mantenuti ad una temperatura ambiente (T_a) = 24°C, nel grafico a) e per gli animali del gruppo 2 (esposti ad una T_a = 10°C dalle 9:00 alle 17:00 del giorno 2, nel grafico b). Ogni animale di ogni gruppo è stato ripetutamente iniettato con l'agonista GABAergico muscimolo durante il giorno 2 (pallini neri, 100 nl, 1 mM, 1 iniezione all'ora bilaterale) e con salina durante il giorno 5 (pallini bianchi, 100 nl, 0,9%, 1 iniezione bilaterale all'ora). La risoluzione temporale è stata di 12h per il giorno 1,3,4 e 6 e di 30 minuti per il giorno 2 e 5. Le linee verticali tratteggiate dividono i giorni sperimentali consecutivi. La T_a , il periodo di luce (L)/buio (B) e la significatività statistica sono posizionati sopra ciascun grafico. Inoltre ciascuna freccia indica un'iniezione. I dati sono visualizzati come media \pm SEM, * = $p < 0,05$

ESPERIMENTO A

PRESSIONE ARTERIOSA MEDIA



a

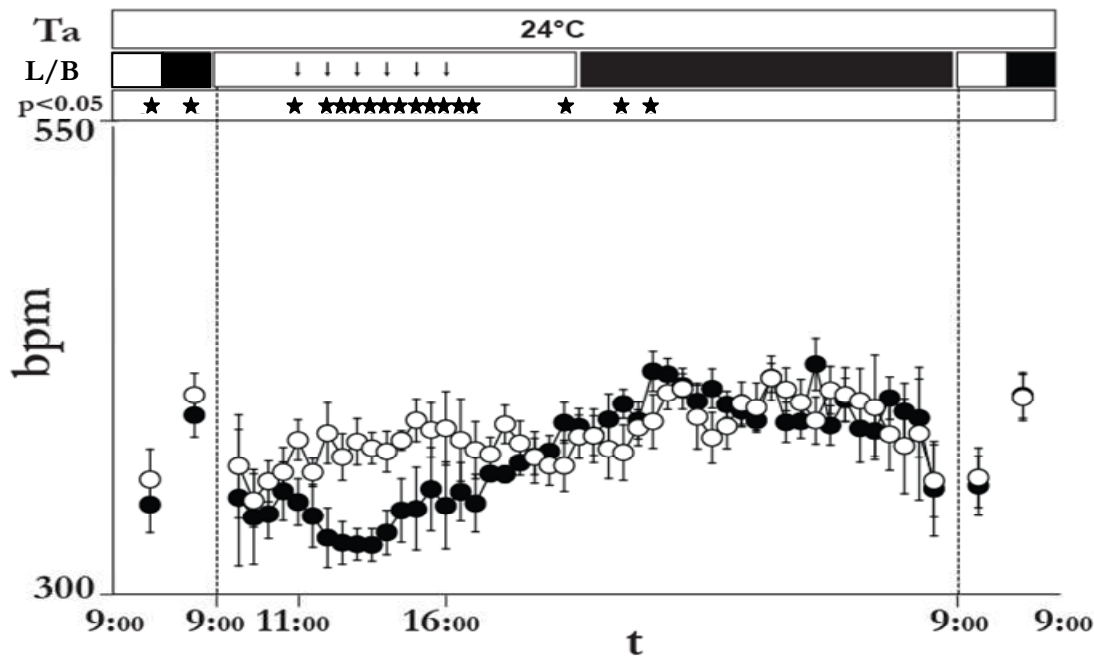


b

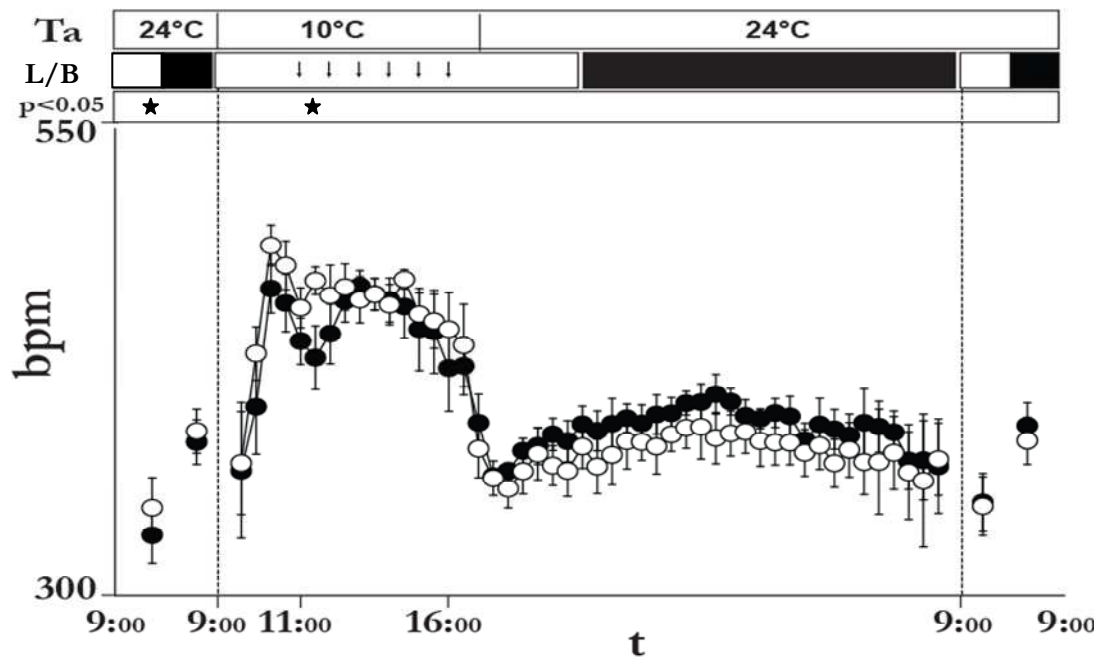
Figura 16. La figura mostra l'andamento della frequenza cardiaca nei sei giorni sperimentali per gli animali del gruppo 1 (mantenuti ad una temperatura ambiente (T_a) = 24°C, nel grafico a) e per gli animali del gruppo 2 (esposti ad una T_a = 10°C dalle 9:00 alle 17:00 del giorno 2, nel grafico b). Ogni animale di ogni gruppo è stato ripetutamente iniettato con l'agonista GABAergico muscimolo durante il giorno 2 (pallini neri, 100 nl, 1 mM, 1 iniezione all'ora bilaterale) e con salina durante il giorno 5 (pallini bianchi, 100 nl, 0,9%, 1 iniezione bilaterale all'ora). La risoluzione temporale è stata di 12h per il giorno 1,3,4 e 6 e di 30 minuti per il giorno 2 e 5. Le linee verticali tratteggiate dividono i giorni sperimentali consecutivi. La T_a , il periodo di luce (L)/buio (B) e la significatività statistica sono posizionati sopra ciascun grafico. Inoltre ciascuna freccia indica un'iniezione. I dati sono visualizzati come media \pm SEM, * = $p < 0,05$.

ESPERIMENTO A

FREQUENZA CARDIACA



a

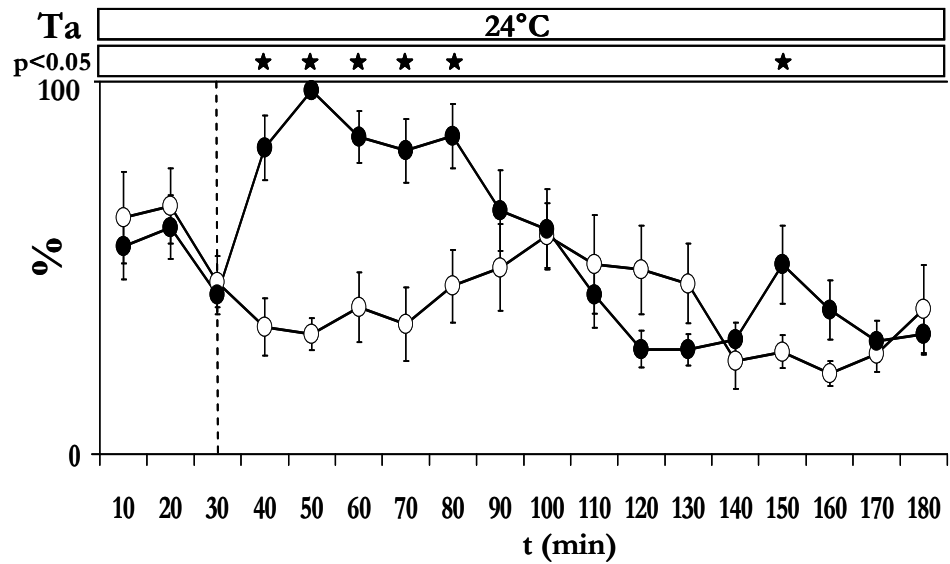


b

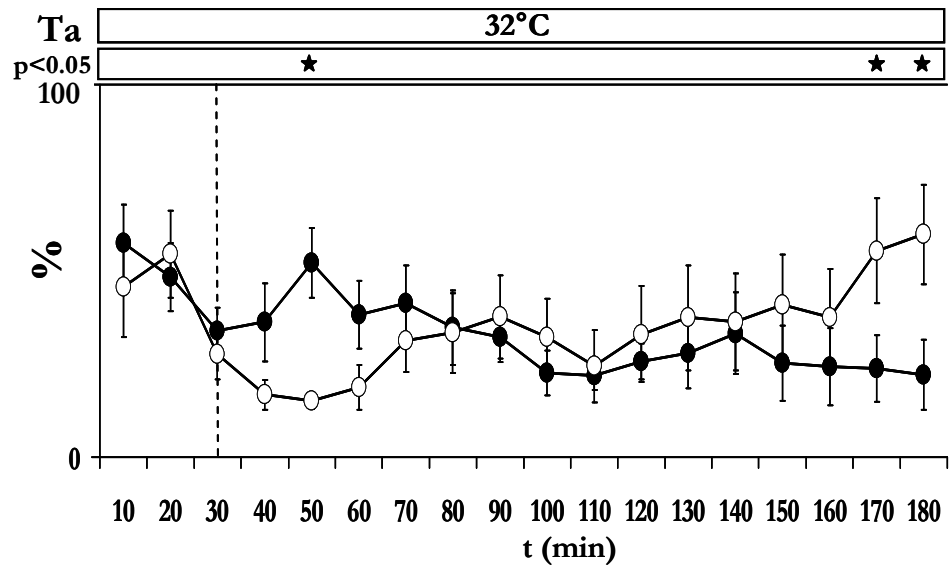
Figura 17. Le tre figure mostrano la quantità del tempo trascorso in veglia (espressa come percentuale di ogni intervallo temporale) durante 180 minuti di registrazione a tre temperature di esposizione ambientale differenti: 24°C (grafico a), 32°C (grafico b) e 10°C (grafico c) a cui ciascun animale è stato esposto in giorni sperimentali consecutivi. I pallini neri indicano i valori risultanti dal trattamento con ipocretina, mentre i pallini bianchi indicano i valori risultanti dal trattamento con salina. Ogni animale è stato iniettato con il neuropeptide ipocretina o con salina. Le iniezioni sono state bilanciate alle diverse temperature. La risoluzione temporale è stata di 10 minuti. La linea verticale tratteggiata indica il momento dell'iniezione. La Ta e la significatività statistica sono posizionate sopra ciascun grafico. I dati sono visualizzati come media \pm SEM, * = $p < 0,05$.

ESPERIMENTO B

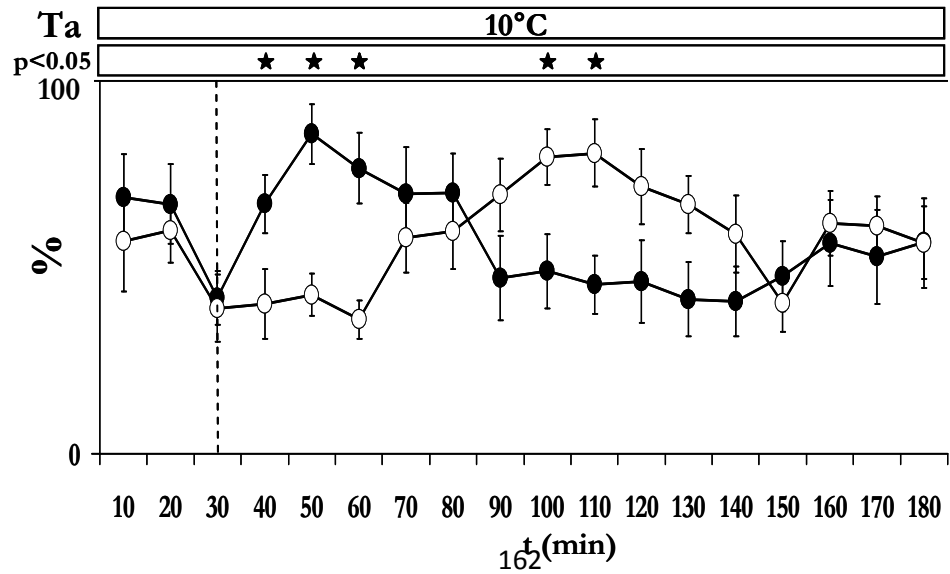
VEGLIA - Quantità



a



b

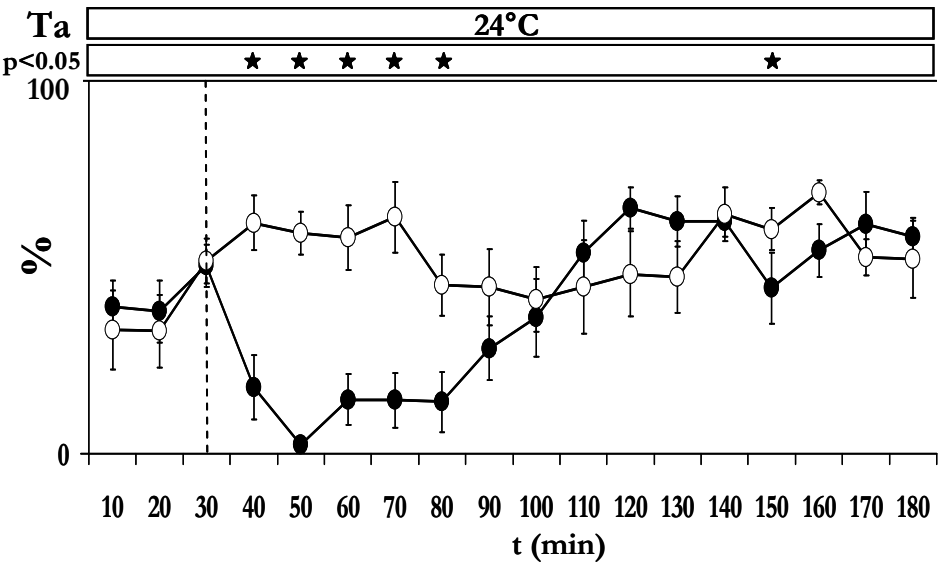


c

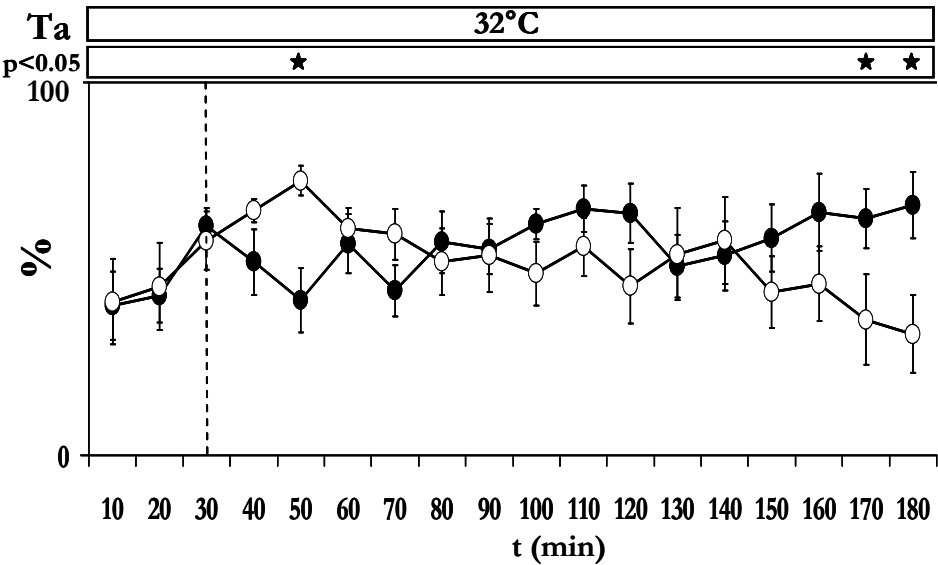
Figura 18. Le tre figure mostrano la quantità del tempo trascorso in sonno NREM (espressa come percentuale di ogni intervallo temporale) durante 180 minuti di registrazione a tre temperature di esposizione ambientale differenti: 24°C (grafico a), 32°C (grafico b) e 10°C (grafico c) a cui ciascun animale è stato esposto in giorni sperimentali consecutivi. I pallini neri indicano i valori risultanti dal trattamento con ipocretina, mentre i pallini bianchi indicano i valori risultanti dal trattamento con salina. Ogni animale è stato iniettato con il neuropeptide ipocretina o con salina. Le iniezioni sono state bilanciate alle diverse temperature. La risoluzione temporale è stata di 10 minuti. La linea verticale tratteggiata indica il momento dell'iniezione. La Ta e la significatività statistica sono posizionate sopra ciascun grafico. I dati sono visualizzati come media \pm SEM, * = $p < 0,05$.

ESPERIMENTO B

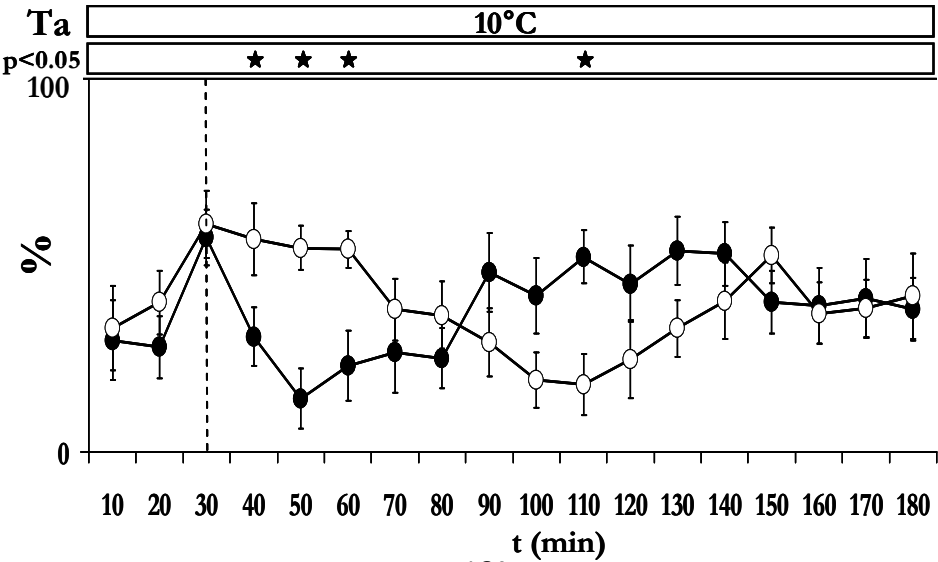
SONNO NREM – Quantità



a



b

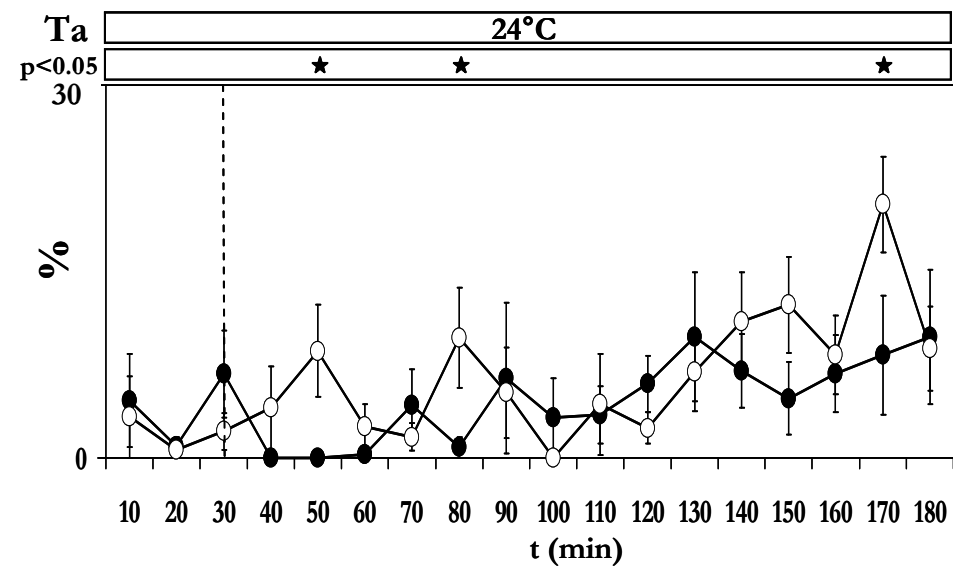


c

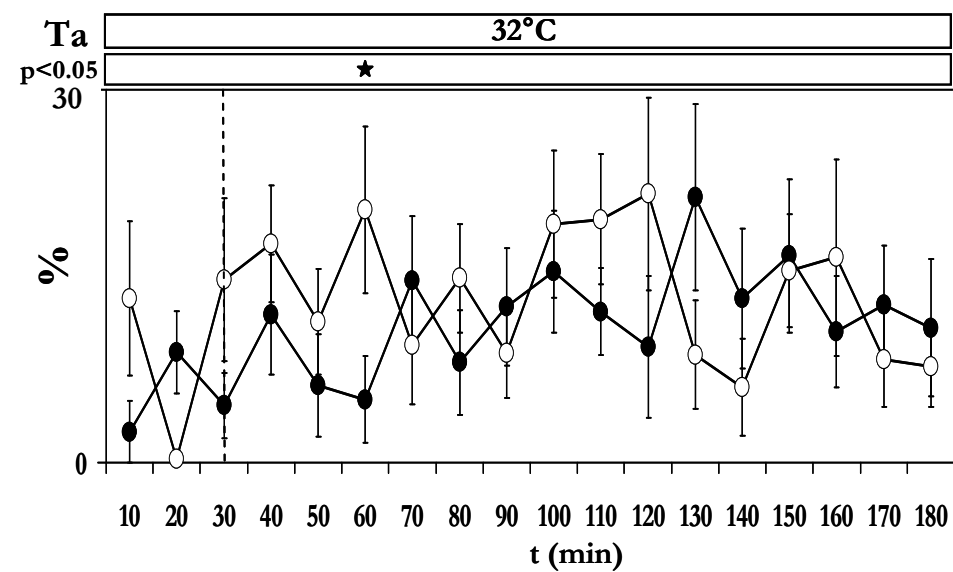
Figura 19. Le tre figure mostrano la quantità del tempo trascorso in sonno REM (espressa come percentuale di ogni intervallo temporale) durante 180 minuti di registrazione a tre temperature di esposizione ambientale differenti: 24°C (grafico a), 32°C (grafico b) e 10°C (grafico c) a cui ciascun animale è stato esposto in giorni sperimentali consecutivi. I pallini neri indicano i valori risultanti dal trattamento con ipocretina, mentre i pallini bianchi indicano i valori risultanti dal trattamento con salina. Ogni animale è stato iniettato con il neuropeptide ipocretina o con salina. Le iniezioni sono state bilanciate alle diverse temperature. La risoluzione temporale è stata di 10 minuti. La linea verticale tratteggiata indica il momento dell'iniezione. La Ta, e la significatività statistica sono posizionate sopra ciascun grafico. I dati sono visualizzati come media \pm SEM, * = $p < 0,05$.

ESPERIMENTO B

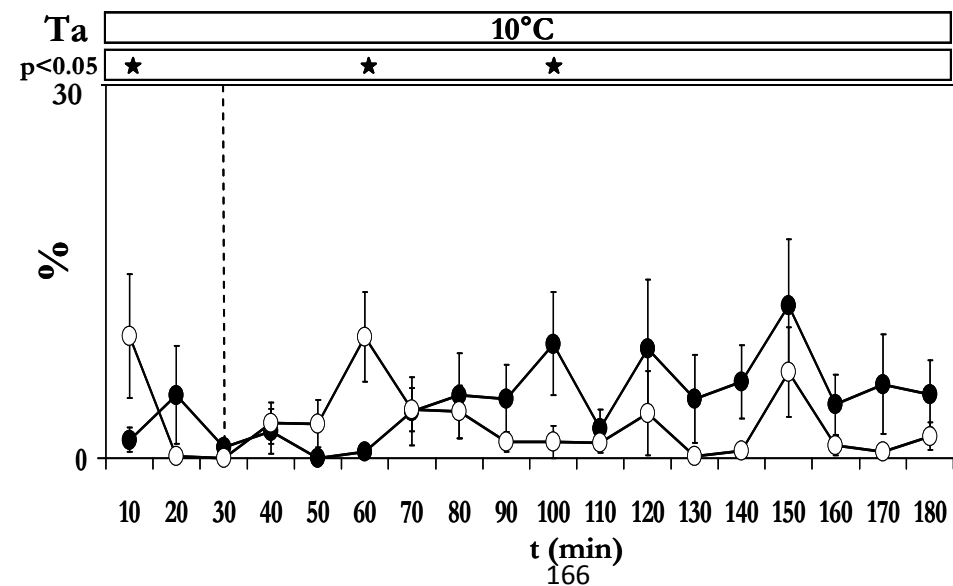
SONNO REM - Quantità



a



b

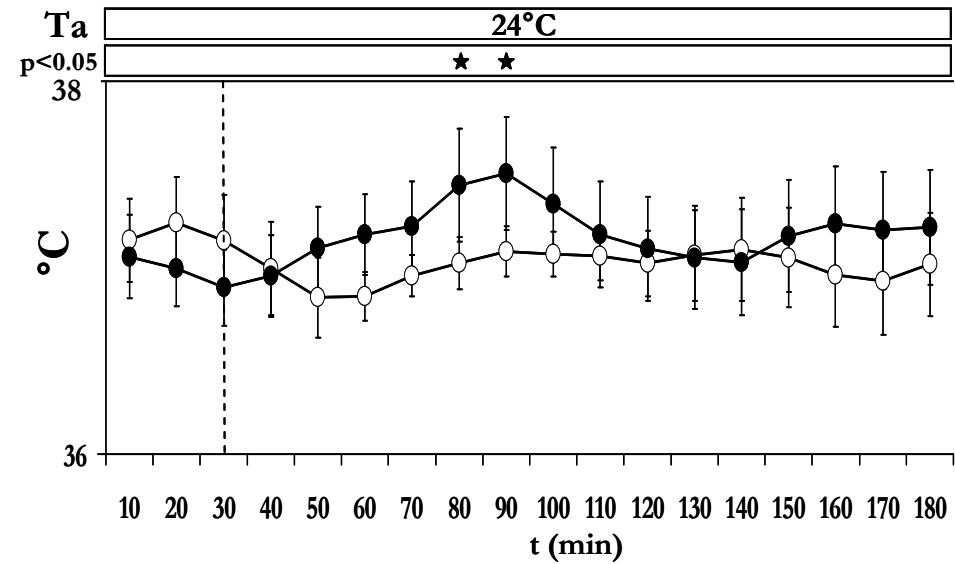


c

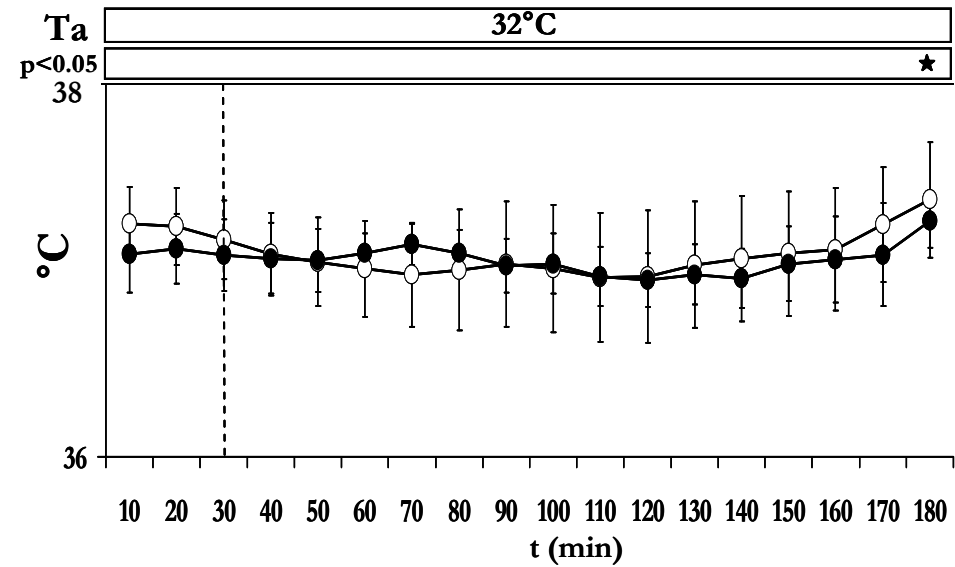
Figura 20. Le tre figure mostrano l'andamento della temperatura ipotalamica (°C) durante 180 minuti di registrazione a tre temperature di esposizione ambientale differenti: 24°C (grafico a), 32°C (grafico b) e 10°C (grafico c) a cui ciascun animale è stato esposto in giorni sperimentali consecutivi. I pallini neri indicano i valori risultanti dal trattamento con ipocretina, mentre i pallini bianchi indicano i valori risultanti dal trattamento con salina. Ogni animale è stato iniettato con il neuropeptide ipocretina o con salina. Le iniezioni sono state bilanciate alle diverse temperature. La risoluzione temporale è stata di 10 minuti. La linea verticale tratteggiata indica il momento dell'iniezione. La Ta, e la significatività statistica sono posizionate sopra ciascun grafico. I dati sono visualizzati come media \pm SEM, * = $p < 0,05$.

ESPERIMENTO B

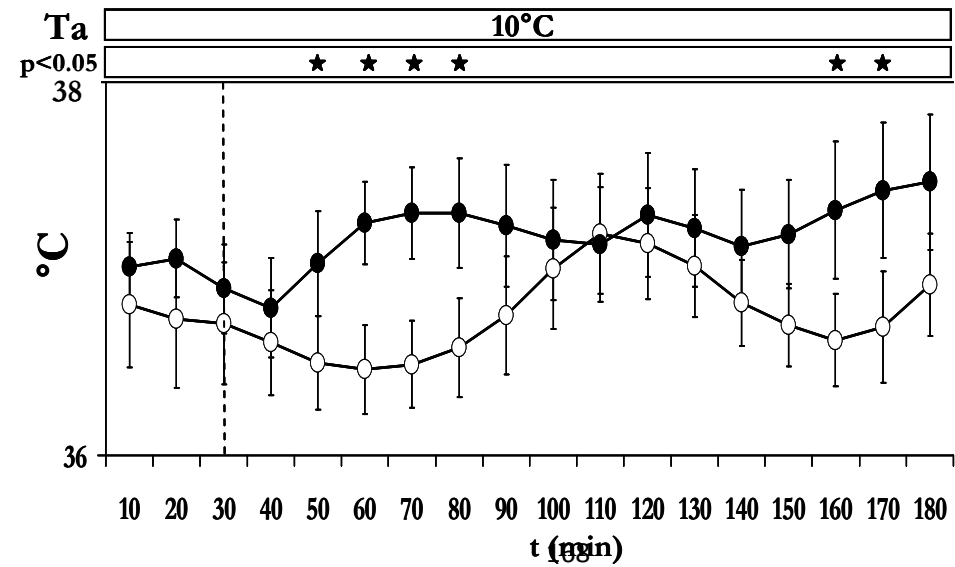
TEMPERATURA IPOTALAMICA



a



b

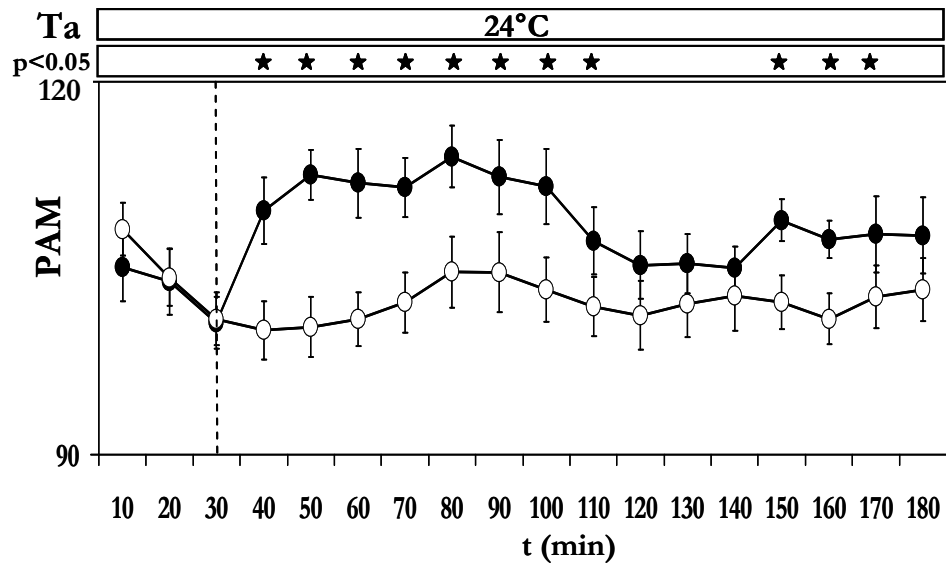


c

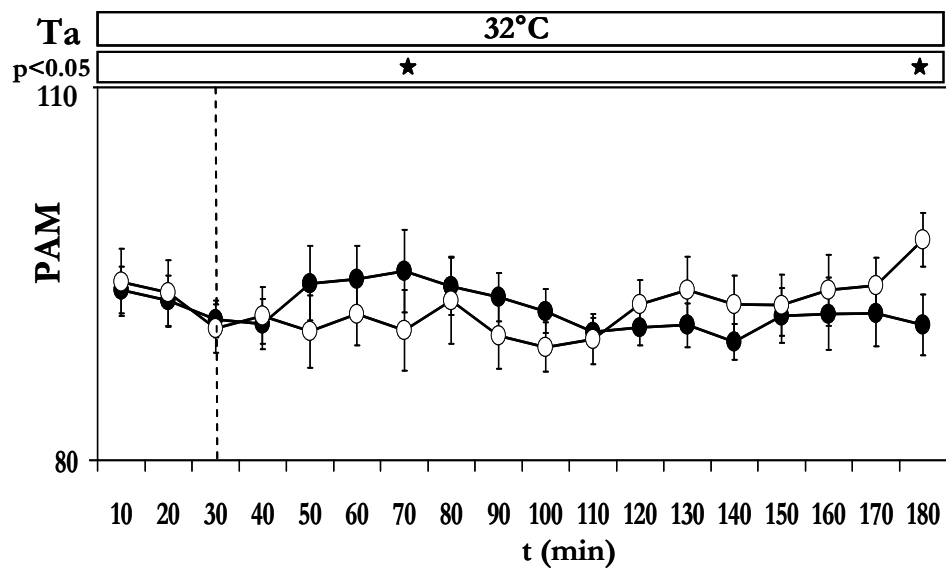
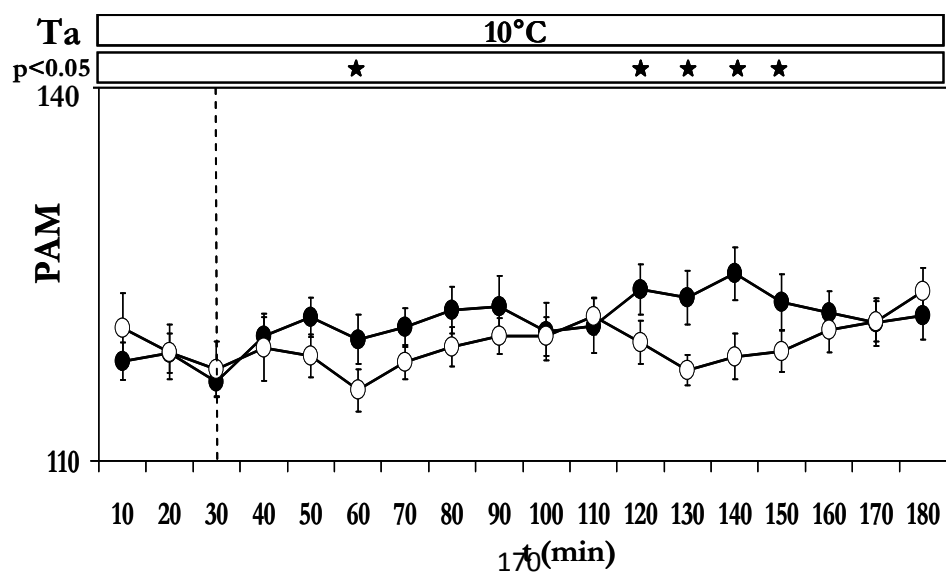
Figura 21. Le tre figure mostrano l'andamento della pressione arteriosa media durante 180 minuti di registrazione a tre temperature di esposizione ambientale differenti: 24°C (grafico a), 32°C (grafico b) e 10°C (grafico c) a cui ciascun animale è stato esposto in giorni sperimentali consecutivi. I pallini neri indicano i valori risultanti dal trattamento con ipocretina, mentre i pallini bianchi indicano i valori risultanti dal trattamento con salina. Ogni animale è stato iniettato con il neuropeptide ipocretina o con salina. Le iniezioni sono state bilanciate alle diverse temperature. La risoluzione temporale è stata di 10 minuti. La linea verticale tratteggiata indica il momento dell'iniezione. La Ta, e la significatività statistica sono posizionate sopra ciascun grafico. I dati sono visualizzati come media \pm SEM, * = $p < 0,05$.

ESPERIMENTO B

PRESSIONE ARTERIOSA MEDIA



a

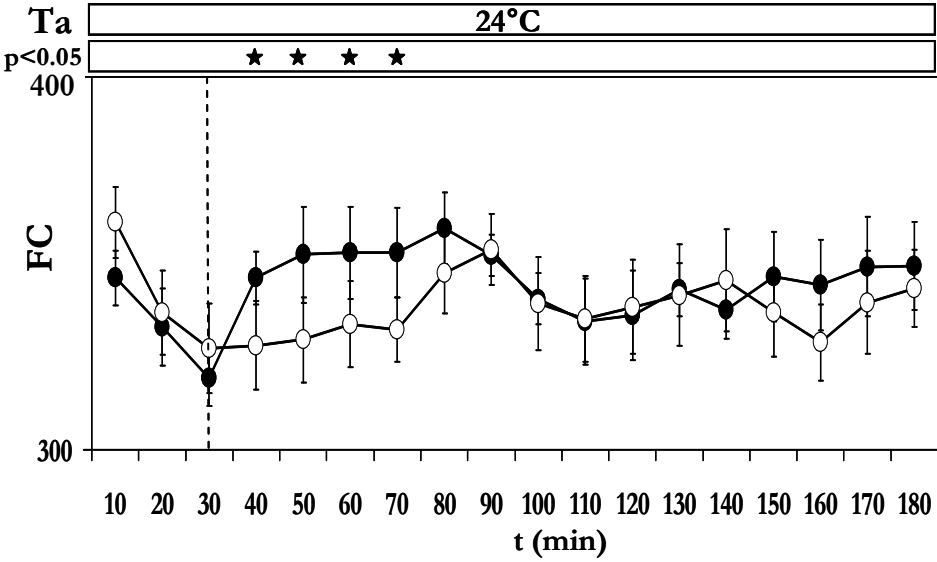
**b**

c

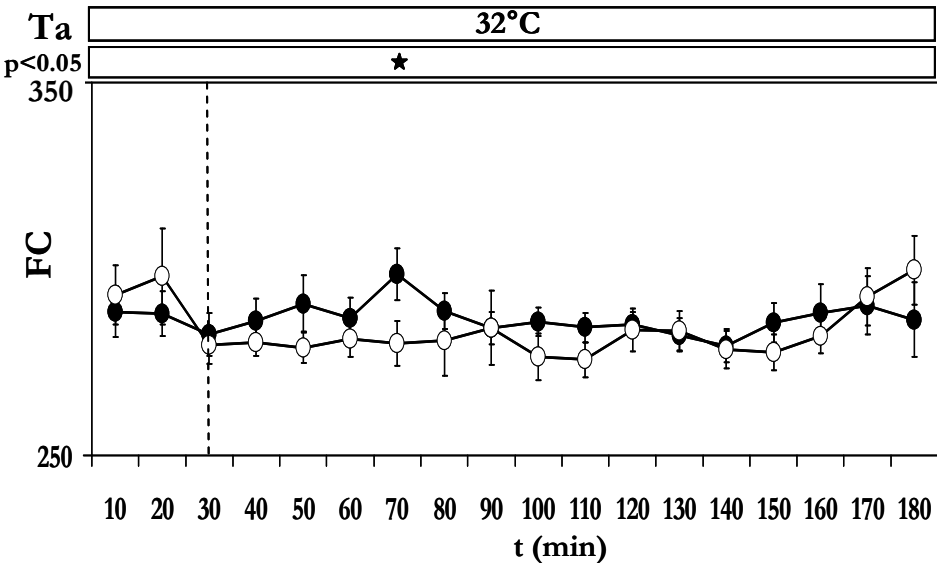
Figura 22. Le tre figure mostrano l'andamento della frequenza cardiaca durante 180 minuti di registrazione a tre temperature di esposizione ambientale differenti: 24°C (grafico a), 32°C (grafico b) e 10°C (grafico c) a cui ciascun animale è stato esposto in giorni sperimentali consecutivi. I pallini neri indicano i valori risultanti dal trattamento con ipocretina, mentre i pallini bianchi indicano i valori risultanti dal trattamento con salina. Ogni animale è stato iniettato con il neuropeptide ipocretina o con salina. Le iniezioni sono state bilanciate alle diverse temperature. La risoluzione temporale è stata di 10 minuti. La linea verticale tratteggiata indica il momento dell'iniezione. La Ta, e la significatività statistica sono posizionate sopra ciascun grafico. I dati sono visualizzati come media \pm SEM, * = $p < 0,05$.

ESPERIMENTO B

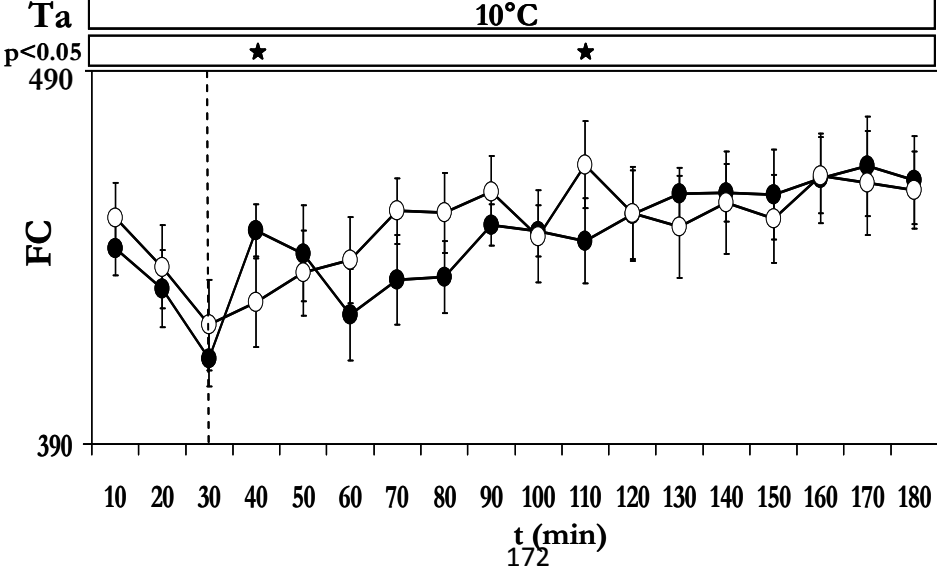
FREQUENZA CARDIACA



a



b



c

BIBLIOGRAFIA

- Abrahamson, E., Leak, R., & Moore, R. (2001). The suprachiasmatic nucleus projects to posterior hypothalamic arousal systems. *Neuroreport*, 12, 435-440.
- Achermann, P., & AA, B. (2010). Sleep homeostasis and models of sleep regulation. *Kryger M, Roth T, Dement W (Eds). Principles and Practices of Sleep Medicine (5th edition). Elsevier Saunders, Missouri*, 431-444.
- Adamantidis, A., & de Lecea, L. (2008). Physiological arousal: a role for hypothalamic systems. *Cell Mol Life Sci*, 65, 1475-1488.
- Adamantidis, A., Zhang, F., Aravanis, A., Deisseroth, K., & DeLecea, L. (2007). Neural substrates of awakening probed with optogenetic control of hypocretin neurons. *Nature*, 450, 420-424.
- Akiyama, M., Yuasa, T., Hayasaka, N., Horikawa, K., Sakurai, T., & Shibata, S. (2004). Reduced food anticipatory activity in genetically orexin (hypocretin) neuron-ablated mice. *Eur J Neurosci*, 20(11), 3054-3062.
- Alam, M., McGinty, O., & Szymusiak, R. (1995). Neuronal discharge of preoptic / anterior hypothalamic thermosensitive neurons: relation to NREM sleep. *Am J Physiol.*, 269, R1240-1249.
- Alcantara, S., Ruiz, M., D'Arcangelo, G., Ezan, F., de Lecea, L., Curran, T., Sotelo, C., & Soriano, E. (1998). Regional and cellular patterns of reelin mRNA expression in the forebrain of the developing and adult mouse. *J Neurosci*, 18(19), 7779-7799.
- Alfoldi, P., Rubicsek, G., Cserni, G., & Obal, F. J. (1990). Brain and core temperatures and peripheral vasomotion during sleep and wakefulness at various ambient temperatures in the rat. *Pflugers Arch.*, 417, 336-341.
- Amici, R., Cerri, M., Ocampo-Garces, A., Baracchi, F., Dentico, D., Jones, C. A., Luppi, M., Perez, E., Parmeggiani, P. L., & Zamboni, G. (2008). Cold exposure

- and sleep in the rat: REM sleep homeostasis and body size. *Sleep*, 31(5), 708-715.
- Amici, R., Zamboni, G., Perez, E., Jones, C. A., Toni, I. I., Culin, F., & Parmeggiani, P. L. (1994). Pattern of desynchronized sleep during deprivation and recovery induced in the rat by changes in ambient temperature. *J Sleep Res*, 3(4), 250-256.
- Anand, B. K., Chhina, G. S., Sharma, K. N., Dua, S., & Singh, B. (1964). Activity of Single Neurons in the Hypothalamic Feeding Centers: Effect of Glucose. *Am J Physiol*, 207, 1146-1154.
- Bacelli, G., Albertini, R., Mancina, G., & Zanchetti, A. (1978). Control of regional circulations by the sino-aortic reflexes during desynchronised sleep in the cat. *Cardiovasc Res*, 12(9), 523-528.
- Bacelli, G., Albertini, R., & Manda, G. (1974). Central and reflex regulation of sympathetic vasoconstrictor activity of limb muscle during desynchronized sleep in the cat. *Circ Res.*, 35, 625-635.
- Bahary N, L. R., Joseph L, Friedman JM. (1990). Molecular mapping of the mouse db mutation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 87(21), 8642-8646.
- Baust, W., & Bohnert, B. (1969). The regulation of heart rate during sleep. *Exp Brain Res*, 7(2), 169-180.
- Bayer, L., Mairet-Coello, G., Risold, P. Y., & Griffond, B. (2002). Orexin/hypocretin neurons: chemical phenotype and possible interactions with melanin-concentrating hormone neurons. *Regul Pept*, 104(1-3), 33-39.
- Behbehani, M., & Da Costa, G. (1996). Properties of a projection pathway from the medial preoptic nucleus to the midbrain periaqueductal gray of the rat and its role in the regulation of cardiovascular function. *Brain Res.*, 740, 141-150.

- Benington, J. H., & Heller, H. C. (1994). REM-sleep timing is controlled homeostatically by accumulation of REM-sleep propensity in non-REM sleep. *Am J Physiol*, 266(6 Pt 2), R1992-2000.
- Berk, M., & Finkelstein, J. (1982). Efferent connections of the lateral hypothalamic area of the rat: an autoradiographic investigation. *Brain Res Bull*, 5(5), 511-526.
- Berthoud, H., Patterson, L., Sutton, G., Morrison, C., & Zheng, H. (2005). Orexin inputs to caudal raphe neurons involved in thermal, cardiovascular, and gastrointestinal regulation. *Histochem Cell Biol.*, 123(2), 147-156.
- Bettica, P., Squassante, L., Groeger, J. A., Gennery, B., Winsky-Sommerer, R., & Dijk, D. J. Differential effects of a dual orexin receptor antagonist (SB-649868) and zolpidem on sleep initiation and consolidation, SWS, REM sleep, and EEG power spectra in a model of situational insomnia. *Neuropsychopharmacology*, 37(5), 1224-1233.
- Bicego, K. C., Barros, R. C., & Branco, L. G. (2007). Physiology of temperature regulation: comparative aspects. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 147(3), 616-639.
- Bittencourt, J. C., Presse, F., Arias, C., Peto, C., Vaughan, J., Nahon, J. L., Vale, W., & Sawchenko, P. E. (1992). The melanin-concentrating hormone system of the rat brain: an immuno- and hybridization histochemical characterization. *J Comp Neurol*, 319(2), 218-245.
- Blessing, W. W., & Nalivaiko, E. (2001). Raphe magnus/pallidus neurons regulate tail but not mesenteric arterial blood flow in rats. *Neuroscience*, 105(4), 923-929.
- Blessing, W. W., Yu, Y. H., & Nalivaiko, E. (1999). Raphe pallidus and parapyramidal neurons regulate ear pinna vascular conductance in the rabbit. *Neurosci Lett*, 270(1), 33-36.

- Borbely, A. A., Steigrad, P., & Tobler, I. (1980). Effect of sleep deprivation on brain serotonin in the rat. *Behav Brain Res*, 1(2), 205-210.
- Borowsky, B., Durkin, M., Ogozalek, K., Marzabadi, M., DeLeon, J., & Lagu, B. (2002). Antidepressant, anxiolytic and anorectic effects of a melanin-concentrating hormone-1 receptor antagonist. *Nat Med*, 8, 825-830.
- Borowsky, B., Durkin, M. M., Ogozalek, K., Marzabadi, M. R., DeLeon, J., Lagu, B., Heurich, R., Lichtblau, H., Shaposhnik, Z., Daniewska, I., Blackburn, T. P., Branchek, T. A., Gerald, C., Vaysse, P. J., & Forray, C. (2002). Antidepressant, anxiolytic and anorectic effects of a melanin-concentrating hormone-1 receptor antagonist. *Nat Med*, 8(8), 825-830.
- Bourgin, P., Huitrón-Résendiz, S., Spier, A., Fabre, V., Morte, B., Criado, J., Sutcliffe, J., Henriksen, S., & De Lecea, L. (2000). Hypocretin-1 modulates rapid eye movement sleep through activation of locus coeruleus neurons. *J Neurosci*, 20(20), 7760-7765.
- Boutrel, B., Kenny, P. J., Specio, S. E., Martin-Fardon, R., Markou, A., Koob, G. F., & de Lecea, L. (2005). Role for hypocretin in mediating stress-induced reinstatement of cocaine-seeking behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(52), 19168-19173.
- Brisbare-Roch, C., Dingemanse, J., Koberstein, R., Hoever, P., Aissaoui, H., Flores, S., Mueller, C., Nayler, O., van Gerven, J., de Haas, S. L., Hess, P., Qiu, C., Buchmann, S., Scherz, M., Weller, T., Fischli, W., Clozel, M., & Jenck, F. (2007). Promotion of sleep by targeting the orexin system in rats, dogs and humans. *Nat Med*, 13(2), 150-155.

- Bronsky, J., Nedvidkova, J., Zamrazilova, H., Pechova, M., Chada, M., Kotaska, K., Nevoral, J., & Prusa, R. (2007). Dynamic changes of orexin A and leptin in obese children during body weight reduction. *Physiol Res*, 56(1), 89-96.
- Brown, J. W., Sirlin, E. A., Benoit, A. M., Hoffman, J. M., & Darnall, R. A. (2008). Activation of 5-HT1A receptors in medullary raphe disrupts sleep and decreases shivering during cooling in the conscious piglet. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 294(3), R884-894.
- Burdakov, D., Gerasimenko, O., & Verkhatsky, A. (2005). Physiological changes in glucose differentially modulate the excitability of hypothalamic melanin-concentrating hormone and orexin neurons in situ. *J Neurosci*, 25(9), 2429-2433.
- Burlet, S., Tyler, C., & Leonard, C. (2002). Direct and indirect excitation of latero dorsal tegmental neurons by Hypocretin/Orexin peptides: implications for wakefulness and narcolepsy. *J Neurosci*, 22, 2862-2872.
- Cador, M., Kelley, A., Le Moal, M., & Stinus, L. (1986). Ventral tegmental area infusion of substance P, neurotensin and enkephalin: differential effects on feeding behavior. *Neuroscience*, 18(3), 659-669.
- Cai, X., Widdowson, P., Harrold, J., Wilson, S., Buckingham, R., Arch, J., Tadayyon, M., Clapham, J., Wilding, J., & Williams, G. (1999). Hypothalamic orexin expression: modulation by blood glucose and feeding. *Diabetes*, 48(11), 2132-2137.
- Calasso, M., Zantedeschi, E., & Parmeggiani, P. (1993). Cold-defense function of brown adipose tissue during sleep. *Am J Physiol*, 265, R1060-1064.
- Cannon, B., & Nedergaard, J. (2004). Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev*, 84(1), 277-359.

- Cannon, W. (1915). Bodily Changes in Pain, Hunger, Fear and Rage. *New York, NY: D. Appleton & Company.*
- Cano, G., Passerin, A. M., Schiltz, J. C., Card, J. P., Morrison, S. F., & Sved, A. F. (2003). Anatomical substrates for the central control of sympathetic outflow to interscapular adipose tissue during cold exposure. *J Comp Neurol*, 460(3), 303-326.
- Cao, W., & Morrison, S. (2003). Disinhibition of rostral raphe pallidus neurons increases cardiac sympathetic nerve activity and heart rate. *Brain Res*, 980(1), 1-10.
- Capitani, P., Cerri, M., & Amici, R. (2005). Changes in EEG activity and hypothalamic temperature as indices for non-REM sleep to REM sleep transitions. *Neurosci. Lett*, 383, 182-187.
- Carter, M., Adamantidis, A., Ohtsu, H., Deisseroth, K., & DeLecea, L. (2009). Sleep homeostasis modulates hypocretin-mediated sleep to wake transitions. *J Neurosci.*, 29, 10939-10949.
- Cerri, M., Mastrotto, M., Tupone, D., Martelli, D., Luppi, M., Perez, E., Zamboni, G., & Amici, R. The inhibition of neurons in the central nervous pathways for thermoregulatory cold defense induces a suspended animation state in the rat. *J Neurosci*, 33(7), 2984-2993.
- Cerri, M., & Morrison, S. (2005). Activation of lateral hypothalamic neurons stimulates brown adipose tissue thermogenesis. *Neuroscience*, 135, 627-638.
- Cerri, M., Ocampo-Garcés, A., Amici, R., Baracchi, F., Capitani, P., Jones, C. A., Luppi, M., Perez, E., Parmeggiani, P. L., & Zamboni, G. (2005). Cold exposure and sleep in the rat: effects on sleep architecture and the electroencephalogram. *Sleep*, 28(6), 694-705.

- Chemelli, R. M., Willie, J. T., Sinton, C. M., Elmquist, J. K., Scammell, T., Lee, C., Richardson, J. A., Williams, S. C., Xiong, Y., Kisanuki, Y., Fitch, T. E., Nakazato, M., Hammer, R. E., Saper, C. B., & Yanagisawa, M. (1999). Narcolepsy in orexin knockout mice: molecular genetics of sleep regulation. *Cell*, 98(4), 437-451.
- Chen, C., Hwang, L., Chang, J., & Dun, N. (2000). Pressor effects of orexins injected intracisternally and to rostral ventrolateral medulla of anesthetized rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 278(3), R692-697.
- Cheng, S., Kuchiiwa, S., Gao, H., Kuchiiwa, T., & Nakagawa, S. (2003). Morphological study of orexin neurons in the hypothalamus of the Long-Evans rat, with special reference to co-expression of orexin and NADPH-diaphorase or nitric oxide synthase activities. *Neurosci. Res*, 46, 53-62.
- Chou, T. C., Bjorkum, A. A., Gaus, S. E., Lu, J., Scammell, T. E., & Saper, C. B. (2002). Afferents to the ventrolateral preoptic nucleus. *J Neurosci*, 22(3), 977-990.
- Chou, T. C., Lee, C. E., Lu, J., Elmquist, J. K., Hara, J., Willie, J. T., Beuckmann, C. T., Chemelli, R. M., Sakurai, T., Yanagisawa, M., Saper, C. B., & Scammell, T. E. (2001). Orexin (hypocretin) neurons contain dynorphin. *J Neurosci*, 21(19), RC168.
- Ciriello, J., McMurray, J., Babic, T., & de Oliveira, C. (2003). Collateral axonal projections from hypothalamic hypocretin neurons to cardiovascular sites in nucleus ambiguus and nucleus tractus solitarius. *Brain Res*, 991(1-2), 133-141.
- Clegg, D., Air, E., Benoit, S., Sakai, R., Seeley, R., & Woods, S. (2003). Intraventricular melanin-concentrating hormone stimulates water intake

- independent of food intake. *Am J Physiol. Regul Integr Comp Physiol.*, 284, R494-499.
- Clément, O., Sapin, E., Libourel, P., Arthaud, S., Brischoux, F., Fort, P., & Luppi, P. (2012). The lateral hypothalamic area controls paradoxical (REM) sleep by means of descending projections to brainstem GABAergic neurons. *Neurosci*, 32(47), 16763-16774.
- Coccagna, G., Mantovani, M., Brignani, F., Manzini, A., & Lugaresi, E. (1971). Laboratory note. Arterial pressure changes during spontaneous sleep in man. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 31(3), 277-281.
- Coccagna, G., Mantovani, M., & Lugaresi, E. (1971). Arterial pressure changes during spontaneous sleep in man. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.*, 31, 277-281.
- Cohen, P., Zhao, C., Cai, X., Montez, J., Rohani, S., Feinstein, P., Mombaerts, P., & Friedman, J. (2001). Selective deletion of leptin receptor in neurons leads to obesity. *Clin. Invest.*, 108(8), 1113-1121.
- Conway, J., Boon, N., & Jones, I. (1983). Involvement of the baroreceptor reflexes in the changes in blood pressure with sleep and mental arousal. *Hypertension*, 5, 745-748.
- Corradetti, R., Pugliese, A. M., Le Poul, E., Laaris, N., Hamon, M., & Lanfumey, L. (1996). Electrophysiological effects of WAY 100635, a new 5-HT_{1A} receptor antagonist, on dorsal raphe nucleus serotonergic neurones and CA1 pyramidal cells in vitro. *Acta Physiol Hung*, 84(4), 407-409.
- Cowley, A. J., Hinojosa-Laborde, E., & Barber, B. (1989). Short-term autoregulation of systemic blood flow and cardiac output. *News Physiologic Sci.*, 4, 219-225.
- Craig, A. D. (2002). How do you feel? Interoception: the sense of the physiological condition of the body. *Nat Rev Neurosci*, 3(8), 655-666.

- Deboer, T. (1998). Brain temperature dependent changes in the electroencephalogram power spectrum of humans and animals. *J Sleep Res*, 7(4), 254-262.
- Deboer, T., & Tobler, I. (1995). Temperature dependence of EEG frequencies during natural hypothermia. *Brain Res*, 670(1), 153-156.
- Dement, W. (1960). The effect of dream deprivation. *Science*, 131(3415), 1705-1707.
- Dentico, D., Amici, R., Baracchi, F., Cerri, M., Del Sindaco, E., Luppi, M., Martelli, D., Perez, E., & Zamboni, G. (2009). c-Fos expression in preoptic nuclei as a marker of sleep rebound in the rat. *Eur J Neurosci*, 30(4), 651-661.
- Dewasmes, G., Bothorel, B., Candas, V., & Libert, J. P. (1997). A short-term poikilothermic period occurs just after paradoxical sleep onset in humans: characterization changes in sweating effector activity. *J Sleep Res*, 6(4), 252-258.
- Dijk, D., Brunner, D., Beersma, D., & Borbély, A. (1990). Electroencephalogram power density and slow wave sleep as a function of prior waking and circadian phase. *Sleep*, 13(5), 430-440.
- Dijk, D. J., Brunner, D. P., Beersma, D. G., & Borbely, A. A. (1990). Electroencephalogram power density and slow wave sleep as a function of prior waking and circadian phase. *Sleep*, 13(5), 430-440.
- Dufour, R., & Court, L. (1977). [Output of the cerebral circulation during paradoxical sleep in the rabbit]. *Arch Ital Biol*, 115(1), 57-76.
- Dulloo, A., Samec, S., & J, S. (2001). Uncoupling protein 3 and fatty acid metabolism. *Biochemical Society transactions*, 29, 785-791.
- Economo, C. v. (1929). Die encephalitis lethargica, ihre Nachkrankheiten und ihre Behandlung. *Urban and Schwarzenberg, Berlin und Wien*, 251.

- Edwards, C. M., Abusnana, S., Sunter, D., Murphy, K. G., Ghatei, M. A., & Bloom, S. R. (1999). The effect of the orexins on food intake: comparison with neuropeptide Y, melanin-concentrating hormone and galanin. *J Endocrinol*, *160*(3), R7-12.
- Elias, C., Saper, C., Maratos-Flier, E., Tritos, N., Lee, C., & Kelly, J. (1998). Chemically defined projections linking the mediobasal hypothalamus and the lateral hypothalamic area. *J Compl Neurol*, *402*, 442-459.
- Endo, T., Roth, C., Landolt, H. P., Werth, E., Aeschbach, D., Achermann, P., & Borbely, A. A. (1998). Selective REM sleep deprivation in humans: effects on sleep and sleep EEG. *Am J Physiol*, *274*(4 Pt 2), R1186-1194.
- Epstein, Y., & Roberts, W. O. The pathophysiology of heat stroke: an integrative view of the final common pathway. *Scand J Med Sci Sports*, *21*(6), 742-748.
- Everson, C. A., Gilliland, M. A., Kushida, C. A., Pilcher, J. J., Fang, V. S., Refetoff, S., Bergmann, B. M., & Rechtschaffen, A. (1989). Sleep deprivation in the rat: IX. Recovery. *Sleep*, *12*(1), 60-67.
- Fadel, J., & Deutch, A. (2002). Anatomical substrates of orexin- dopamine interactions: lateral hypothalamic projections to the ventral tegmental area. *Neuroscience*, *111*, 379-387.
- Farooqi, I., Jebb, S., Langmack, G., Lawrence, E., Cheetham, C., Prentice, A., Hughes, I., McCamish, M., & O'Rahilly, S. (1999). Effects of recombinant leptin therapy in a child with congenital leptin deficiency. *Engl. J Med.*, *341*(12), 879-884.
- Fay, R. M., Johannessen, J. N., Zhang, D. X., & Mayer, D. J. (1990). Differential uptake of HRP by intact axon terminals versus transected axons: a study on bulbospinal fibers in the dorsolateral funiculus. *Neurosci Lett*, *114*(2), 141-146.

- Feinberg, I., March, J. D., Floyd, T. C., Jimison, R., Bossom-Demitrack, L., & Katz, P. H. (1985). Homeostatic changes during post-nap sleep maintain baseline levels of delta EEG. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 61(2), 134-137.
- Feng, P. F., Shaw, P., Bergmann, B. M., Obermeyer, W., Tsai, L. L., Zenko, C. E., & Rechtschaffen, A. (1995). Sleep deprivation in the rat: XX. Differences in wake and sleep temperatures during recovery. *Sleep*, 18(9), 797-804.
- Fisher, S., Foster, R., & Peirson, S. (2013). The circadian control of sleep. *Handb Exp Pharmacol.*, 217, 157-183.
- Fort, P., Bassetti, C., & Luppi, P. (2009). Alternating vigilance states: new insights regarding neuronal networks and mechanisms. *Eur J Neurosci.*, 29, 1741-1753.
- Fox, S., Gotter, A., & Tye, S. (2013). Quantitative Electroencephalography Within Sleep/Wake States Differentiates GABAA Modulators Eszopiclone and Zolpidem From Dual Orexin Receptor Antagonists in Rats. *Neuropsychopharmacology*, 38, 2401-2408.
- Franzini. (1990). The control of peripheral circulation during sleep. *Mancla M, Marini G, eds. The Diencephalon and Sleep. New York, NY: Raven Press*, 343-353.
- Franzini, C., Cianci, T., Lenzi, P., & Guidalotti, P. L. (1982). Neural control of vasomotion in rabbit ear is impaired during desynchronized sleep. *Am J Physiol*, 243(1), R142-146.
- Frenken, P., Tobler, I., & Borbèly, A. (1993). Effects of 12-h sleep deprivation and of 12 h cold exposure on sleep regulation and cortical temperature in the rat. *Physiol Behav.*, 54, 885-894.
- Frysiner, R., Marks, J., & Trelease, R. (1984). Sleep states attenuate the pressor response to central amygdala stimulation. *Exp Neurol.*, 83, 604-617.

- Fu, L., Acuna-Goycolea, C., & Van den Pol, A. (2004). Neuropeptide Y inhibits hypocretin/orexin neurons by multiple presynaptic and postsynaptic mechanisms: tonic depression of the hypothalamic arousal system. *J Neurosci.*, 24, 8741-8751.
- Funato, H., Tsai, A. L., Willie, J. T., Kisanuki, Y., Williams, S. C., Sakurai, T., & Yanagisawa, M. (2009). Enhanced orexin receptor-2 signaling prevents diet-induced obesity and improves leptin sensitivity. *Cell Metab*, 9(1), 64-76.
- Furlong, T., Vianna, D., Liu, L., & Carrive, P. (2009). Hypocretin/orexin contributes to the expression of some but not all forms of stress and arousal. *Eur J Neurosci.*, 30, 1603-1614.
- Gilmore, J., & Tomomatsu, E. (1984). Comparison of carotid sinus barore-receptors in dogs, cats, monkeys, and rabbits. *Am J Physiol.*, 247, R52-56.
- Glotzbach, S. F., & Heller, H. C. (1976). Central nervous regulation of body temperature during sleep. *Science*, 194(4264), 537-539.
- Gong, H., McGinty, D., Guzman-Marin, R., Chew, K. T., Stewart, D., & Szymusiak, R. (2004). Activation of c-fos in GABAergic neurones in the preoptic area during sleep and in response to sleep deprivation. *J Physiol*, 556(Pt 3), 935-946.
- Gordon, C. J. (1990). Thermal biology of the laboratory rat. *Physiol Behav*, 47(5), 963-991.
- Green, J., Baker, B. I. (1991). The influence of repeated stress on the release of melanin-concentrating hormone in the rainbow trout. *J Endocrinol.*, 128(2), 261-266.
- Groenewegen, H., Berendse, H., & Haber, S. (1993). Organization of the output of the ventral striatopallidal system in the rat: ventral pallidal efferents. *Neuroscience*, 57(1), 113-142.

- Groenewegen, H., Wright, C., & Beijer, A. (1996). The nucleus accumbens: gateway for limbic structures to reach the motor system? *Prog Brain Res*, 107, 485-511.
- Guazzi, M., & Zanchetti, A. (1965). Blood pressure and heart rate during natural sleep of the cat and their regulation by carotid sinus and aortic reflexes. *Arch Ital Biol*, 103(4), 789-817.
- Hahn, J., & Swanson, L. (2010). Distinct patterns of neuronal inputs and outputs of the juxtapaaraventricular and supraforrnical regions of the lateral hypothalamic area in the male rat. *Brain Res Rev*, 64, 14-103.
- Hakansson, M., de Lecea, L., Sutcliffe, J. G., Yanagisawa, M., & Meister, B. (1999). Leptin receptor- and STAT3-immunoreactivities in hypocretin/orexin neurones of the lateral hypothalamus. *J Neuroendocrinol*, 11(8), 653-663.
- Halaas, J., Gajiwala, K., Maffei, M., Cohen, S., Chait, B., Rabinowitz, D., Lallone, R., Burley, S., & Friedman, J. (1995). Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science*, 269(5223), 543-546.
- Hara, J., Beuckmann, C., & Nambu, T. (2001). Genetic ablation of orexin neurons in mice results in narcolepsy, hypophagia, and obesity. *Neuron*, 30, 345-354.
- Hara, J., Beuckmann, C., Nambu, T., Willie, J., Chemelli, R., & Sinton, C. (2001). Genetic ablation of orexin neurons in mice results in narcolepsy, hypophagia, and obesity. *Neuron*, 30, 345-354.
- Harris, G., Wimmer, M., & Aston-Jones, G. (2005). A role for lateral hypothalamic orexin neurons in reward seeking. *Nature*, 437, 556-559.
- Hassani, O., Henny, P., Lee, M., & Jones, B. (2010). GABAergic neurons intermingled with orexin and MCH neurons in the lateral hypothalamus discharge maximally during sleep. *Eur J Neurosci*, 32, 448-457.

- Hassani, O., Lee, M., & Jones, B. (2009). Melanin-concentrating hormone neurons discharge in a reciprocal manner to orexin neurons across the sleep-wake cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 106, 2418-2422.
- Hassani, O. K., Henny, P., Lee, M. G., & Jones, B. E. GABAergic neurons intermingled with orexin and MCH neurons in the lateral hypothalamus discharge maximally during sleep. *Eur J Neurosci*, 32(3), 448-457.
- Hawes, J., Brunzell, D., Narasimhaiah, R., Langel, U., Wynick, D., & Picciotto, M. (2008). Galanin protects against behavioral and neurochemical correlates of opiate reward. *Neuropsychopharmacology*, 33(8), 1864-1873.
- Heller, H. (2005). Temperature, Thermoregulation and Sleep. *Kruger MH, Roth T, Dement WC (Eds) Principle and practice of sleep medicine. WB Saunders, Philadelphia*, 292-304.
- Hendricks, J. C. (1982). Absence of shivering in the cat during paradoxical sleep without atonia. *Exp Neurol*, 75(3), 700-710.
- Hess, W. (1954). *Das Zwischenhirn*, 2nd ed. Basel: Schwabe.
- Hobson, J. A. (1989). Sleep. Scientific American Library
- Holm, S. (1979). A simple sequentially rejective multiple test procedure. *Scandinavian journal of statistics*, 6, 65-70.
- Hondo, M., Furutani, N., Yamasaki, M., Watanabe, M., & Sakurai, T. (2011). Orexin neurons receive glycinergic innervations. *PLOS ONE*.
- Horne, J. (2000). Neuroscience. Images of lost sleep. *Nature*, 403(6770), 605-606.
- Ida T, Nakahara K, Murakami T, Hanada R, Nakazato M & Murakami N. (2000). Possible involvement of orexin in the stress reaction in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 270, 318-323.

- Inglis, W., & Winn, P. (1995). The pedunclopontine tegmental nucleus: where the striatum meets the reticular formation. *Prog Neurobiol.*, 47(1), 1-29.
- Ishizuka, T., Murotani, T., & Yamatodani, A. Modanafil activates the histaminergic system through the orexinergic neurons. *Neurosci Lett*, 483(3), 193-196.
- Iwamura, Y., Uchino, Y., Ozawa, S., & Torii, S. (1969). Spontaneous and reflex discharge of a sympathetic nerve during "para-sleep" in decerebrate cat. *Brain Res*, 16(2), 359-367.
- Jego, S., Glasgow, S. D., Herrera, C. G., Ekstrand, M., Reed, S. J., Boyce, R., Friedman, J., Burdakov, D., & Adamantidis, A. R. Optogenetic identification of a rapid eye movement sleep modulatory circuit in the hypothalamus. *Nat Neurosci*, 16(11), 1637-1643.
- Jones, J., Sleight, P., & Smyth, H. (1982). Hemodynamic changes during sleep in man. *Ganten D, Pfaff D, eds. Sleep: Current Topics in Endocrinology. New York, NY: Academic Press*, 213-272.
- Jouvet, D., Vimont, P., & Delorme, F. (1964). [Study of Selective Deprivation of the Paradoxal Phase of Sleep in the Cat]. *J Physiol (Paris)*, 56, 381.
- Junqueira, L. J., & Krieger, E. (1976). Blood pressure and sleep in the rat in normotension and in neurogenic hypertension. *J Physiol (Lond.)*, 259, 725-735.
- Kalra, S. P., Dube, M. G., Pu, S., Xu, B., Horvath, T. L., & Kalra, P. S. (1999). Interacting appetite-regulating pathways in the hypothalamic regulation of body weight. *Endocr Rev*, 20(1), 68-100.
- Kampe, J., Tschop, M., Hollis, J., & Oldfield, B. (2009). An anatomic basis for the communication of hypothalamic, cortical and mesolimbic circuitry in the regulation of energy balance. *Eur J Neurosci.*, 30(3), 415-430.

- Kanamori, N., Sakai, K., Sei, H., Bouvard, A., Salvert, D., Vanni-Mercier, G., & Jouvet, M. (1995). Effect of decerebration on blood pressure during paradoxical sleep in cats. *Brain Res Bull*, 37(5), 545-549.
- Karnani, MM, Venner, A., Jensen, L., Fugger, L., & Burdakov, D. (2011). Direct and indirect control of orexin/hypocretin neurons by glycine receptors. *J Physiol.*, 589, 639-651.
- Kayaba, Y., Nakamura, A., Kasuya, Y., Ohuchi, T., Yanagisawa, M., Komuro, I., Fukuda, Y., & Kuwaki, T. (2003). Attenuated defense response and low basal blood pressure in orexin knockout mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.*, 285(3), R581-593.
- Kerman, I. A., Akil, H., & Watson, S. J. (2006). Rostral elements of sympatho-motor circuitry: a virally mediated transsynaptic tracing study. *J Neurosci*, 26(13), 3423-3433.
- Kerman, I. A., Bernard, R., Rosenthal, D., Beals, J., Akil, H., & Watson, S. J. (2007). Distinct populations of presympathetic-premotor neurons express orexin or melanin-concentrating hormone in the rat lateral hypothalamus. *J Comp Neurol*, 505(5), 586-601.
- Kerman, I. A., Shabrang, C., Taylor, L., Akil, H., & Watson, S. J. (2006). Relationship of presympathetic-premotor neurons to the serotonergic transmitter system in the rat brainstem. *J Comp Neurol*, 499(6), 882-896.
- Khazan, N., & Sawyer, C. H. (1963). "Rebound" Recovery from Deprivation of Paradoxical Sleep in the Rabbit. *Proc Soc Exp Biol Med*, 114, 536-539.
- Kloek, C., Haq, A., Dunn, S., Lavery, H., Banks, A., & Myers, M. J. (2002). Regulation of Jak kinases by intracellular leptin receptor sequences. *J Biol Chem.*, 277(44), 41547-41555.

- Knuepfer, M., Stumpf, H., & G, S. (1986). Baroreceptor sensitivity during desynchronized sleep. *Exp Neurol.*, 92, 323-334.
- Kristensen, P., Judge, M., Thim, L., Ribel, U., Christjansen, K., & Wulff, B. (1998). Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin. *Nature*, 393(6680), 72-76.
- Lacombe, J., Nosjean, A., Meunier, J. M., & Laguzzi, R. (1988). Computer analysis of cardiovascular changes during sleep-wake cycle in Sprague-Dawley rats. *Am J Physiol*, 254(2 Pt 2), H217-222.
- Langley, J. Autonomic nervous system. *Cornell University Library*.
- Laposky, A. D., Bass, J., Kohsaka, A., & Turek, F. W. (2008). Sleep and circadian rhythms: key components in the regulation of energy metabolism. *FEBS Lett*, 582(1), 142-151.
- Lee, M. G., Hassani, O. K., Alonso, A., & Jones, B. E. (2005). Cholinergic basal forebrain neurons burst with theta during waking and paradoxical sleep. *J Neurosci*, 25(17), 4365-4369.
- Lee, M. G., Hassani, O. K., & Jones, B. E. (2005). Discharge of identified orexin/hypocretin neurons across the sleep-waking cycle. *J Neurosci*, 25(28), 6716-6720.
- Leininger, G., & Myers, M. J. (2008). LRb signals act within a distributed network of leptin-responsive neurones to mediate leptin action. *Acta Physiol.*, 192(1), 49-59.
- Lenzi, P., Cianci, T., & Guidalotti, P. (1987). Brain circulation during sleep and its relation to extracerebral hemodynamics. *Brain Res.*, 415, 14-20.
- Leshan, R., Opland, D., Louis, G., Leininger, G., Patterson, C., Rhodes, C., Münzberg, H., & Myers, M. J. (2010). Ventral tegmental area leptin receptor neurons

- specifically project to and regulate cocaine- and amphetamine-regulated transcript neurons of the extended central amygdala. *Neurosci.*, 30(16), 5713-5723.
- Li, Y., Gao, X., Sakurai, T., & Van den Pol, A. (2002). Hypocretin/Orexin excites hypocretin neuron via a local glutamatergic neuron. A potential mechanism for orchestrating the hypothalamic arousal system. *Neuron*, 36, 1169-1181.
- Li, Y., & Van den Pol, A. (2005). Direct and indirect inhibition by catecholamines of hypocretin/orexin neurons. *J Neurosci.*, 25, 173-183.
- Lin, L., Faraco, J., & Li, R. (1999). The sleep disorder canine narcolepsy is caused by a mutation in the hypocretin (orexin) receptor 2 gene. *Cell*, 98, 365-376.
- Liu, X. H., Morris, R., Spiller, D., White, M., & Williams, G. (2001). Orexin a preferentially excites glucose-sensitive neurons in the lateral hypothalamus of the rat in vitro. *Diabetes*, 50(11), 2431-2437.
- Louis, G. W., Leininger, G. M., Rhodes, C. J., & Myers, M. G., Jr. Direct innervation and modulation of orexin neurons by lateral hypothalamic LepRb neurons. *J Neurosci*, 30(34), 11278-11287.
- Luppi, P., Peyron, C., & Fort, P. (2013). Role of MCH Neurons in Paradoxical (REM) Sleep Control. *Sleep Control*, 32(12), 1775-1776.
- Luppi, P., Clément, O., & Fort, P. (2013). Paradoxical (REM) sleep genesis by the brainstem is under hypothalamic control. *Curr Opin Neurobiol.*, 23, 786-792.
- Machado, B., Bonagamba, L., Dun, S., Kwok, E., & Dun, N. (2002). Pressor response to microinjection of orexin/hypocretin into rostral ventrolateral medulla of awake rats. *Regul Pept.*, 104(1-3), 75-81.
- Mancia, G. (1993). Autonomic modulation of the cardiovascular system during sleep. *N Engl J Med*, 328(5), 347-349.

- Mancia, G., & Zanchetti, A. (1980). Cardiovascular regulation during sleep. In: Orem J, Barnes CD, eds. *Physiology in Sleep: Research Topics in Physiology*. New York, NY: Academic Press, 3, 1-55.
- Marston OJ, Hurst P, Evans ML, Burdakov DI & Heisler LK. Neuropeptide Y cells represent a distinct glucose-sensing population in the lateral hypothalamus. *Endocrinology* 152, 4046-4052.
- McAllen, R. M. (1986). Action and specificity of ventral medullary vasopressor neurones in the cat. *Neuroscience*, 18(1), 51-59.
- McAllen, R. M., Neil, J. J., & Loewy, A. D. (1982). Effects of kainic acid applied to the ventral surface of the medulla oblongata on vasomotor tone, the baroreceptor reflex and hypothalamic autonomic responses. *Brain Res*, 238(1), 65-76.
- McGinty, D., & Szymusiak, R. (2001). Brain structures and mechanisms involved in the generation of NREM sleep: focus on the preoptic hypothalamus. *Sleep Med Rev*, 5(4), 323-342.
- Messina, M., & Overton, J. (2007). Cardiovascular effects of melanin-concentrating hormone. *Regul Pept*, 139, 23-30.
- Messina, M. M., & Overton, J. M. (2007). Cardiovascular effects of melanin-concentrating hormone. *Regul Pept*, 139(1-3), 23-30.
- Meunier, J., Nosjean, A., & Lacombe, J. (1988). Cardiovascular changes during the sleep-wake cycle in spontaneous hypertensive rats and in their genetically normotensive precursors. *Pflugers Arch.*, 411, 195-199.
- Mileykovskiy, B. Y., Kiyashchenko, L. I., & Siegel, J. M. (2005). Behavioral correlates of activity in identified hypocretin/orexin neurons. *Neuron*, 46(5), 787-798.

- Mogenson, G., Jones, D., & Yim, C. (1980). From motivation to action: functional interface between the limbic system and the motor system. *Prog Neurobiol.*, 14(02/03/13), 69-97.
- Morden, B., Mitchell, G., & Dement, W. (1967). Selective REM sleep deprivation and compensation phenomena in the rat. *Brain Res*, 5(3), 339-349.
- Morrison, S. F. (1999). RVLM and raphe differentially regulate sympathetic outflows to splanchnic and brown adipose tissue. *Am J Physiol*, 276(4 Pt 2), R962-973.
- Morrison, S. F. (2003). Raphe pallidus neurons mediate prostaglandin E2-evoked increases in brown adipose tissue thermogenesis. *Neuroscience*, 121(1), 17-24.
- Moruzzi, G., & Magoun, H. W. (1949). Brain stem reticular formation and activation of the EEG. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 1(4), 455-473.
- Muraki, Y., Yamanaka, A., Tsujino, N., Kilduff, T., Goto, K., & Sakurai, T. (2004). Serotonergic regulation of orexin/hypocretin neurons through the 5-HT1A receptor. *J Neurosci.*, 24, 7159-7166.
- Nakamura, K., Kaneko, T., Yamashita, Y., Hasegawa, H., Katoh, H., & Negishi, M. (2000). Immunohistochemical localization of prostaglandin EP3 receptor in the rat nervous system. *J Comp Neurol*, 421(4), 543-569.
- Nakamura, K., Matsumura, K., Hubschle, T., Nakamura, Y., Hioki, H., Fujiyama, F., Boldogkoi, Z., Konig, M., Thiel, H. J., Gerstberger, R., Kobayashi, S., & Kaneko, T. (2004). Identification of sympathetic premotor neurons in medullary raphe regions mediating fever and other thermoregulatory functions. *J Neurosci*, 24(23), 5370-5380.
- Nakamura, K., Matsumura, K., Kobayashi, S., & Kaneko, T. (2005). Sympathetic premotor neurons mediating thermoregulatory functions. *Neurosci Res*, 51(1), 1-8.

- Nakamura, K., & Morrison, S. (2007). Central efferent pathways mediating skin cooling evoked sympathetic thermogenesis in brown adipose tissue. *Am J Physiol.*, 292, R127-136.
- Nakamura, K., & Morrison, S. F. A thermosensory pathway mediating heat-defense responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(19), 8848-8853.
- Nakayama, T., Hammel, H., Hardy, J., & Eisemann, J. (1963). Thermal stimulation of electrical activity of single units of the preoptic region. *Am J Physiol.*, 204, 1122-1126.
- Nalivaiko, E., & Blessing, W. W. (2001). Raphe region mediates changes in cutaneous vascular tone elicited by stimulation of amygdala and hypothalamus in rabbits. *Brain Res*, 891(1-2), 130-137.
- Narita, M., Nagumo, Y., Hashimoto, S., Narita, M., Khotib, J., Miyatake, M., Sakurai, T., Yanagisawa, M., Nakamachi, T., Shioda, S., & Suzuki, T. (2006). Direct involvement of orexinergic systems in the activation of the mesolimbic dopamine pathway and related behaviors induced by morphine. *J Neurosci*, 26(2), 398-405.
- Nauta, W. J. (1946). Hypothalamic regulation of sleep in rats; an experimental study. *J Neurophysiol*, 9, 285-316.
- Nieuwenhuys, R., Geeraedts, L., & Veening, J. (1982). The medial forebrain bundle of the rat. A general introduction. *J Comp Neurol.*, 206(1), 49-81.
- Nishino, S., Ripley, B., Overeem, S., Lammers, G., & Mignot, E. (2000). Hypocretin (orexin) deficiency in human narcolepsy. *Lancet*, 355, 39-40.
- Noll, G., Elam, M., Kunimoto, M., Karlsson, T., & Wallin, B. G. (1994). Skin sympathetic nerve activity and effector function during sleep in humans. *Acta Physiol Scand*, 151(3), 319-329.

- Obál, F. J., Rubicsek, G., Alföldi, P., Sáry, G., & Obál, F. (1985). Changes in the brain and core temperatures in relation to the various arousal states in rats in the light and dark periods of the day. *Pflugers Arch.*, 404(1), 73-79.
- Ogawa, T., Satoh, T., & Takagi, K. (1967). Sweating during night sleep. *Jpn J Physiol*, 17(2), 135-148.
- Ootsuka, Y., & Blessing, W. W. (2005). Inhibition of medullary raphe/parapyramidal neurons prevents cutaneous vasoconstriction elicited by alerting stimuli and by cold exposure in conscious rabbits. *Brain Res*, 1051(1-2), 189-193.
- Ootsuka, Y., Blessing, W. W., & McAllen, R. M. (2004). Inhibition of rostral medullary raphe neurons prevents cold-induced activity in sympathetic nerves to rat tail and rabbit ear arteries. *Neurosci Lett*, 357(1), 58-62.
- Opp, M., Toth, L., & Tolley, E. (1997). EEG delta power and auditory arousal in rested and sleep-deprived rabbits. *Am J Physiol.*, 272(2 pt 2), R648-655.
- Otake, K., & Nakamura, Y. (2000). Possible pathways through which neurons of the shell of the nucleus accumbens influence the outflow of the core of the nucleus accumbens. *Brain Dev*, 22(Suppl 1), S17-26.
- Pankevich, D., Teegarden, S., Hedin, A., Jensen, C., & Bale, T. (2010). Caloric restriction experience reprograms stress and orexigenic pathways and promotes binge eating. *J Neurosci.*, 30, 16399-16407.
- Parmeggiani, P. (1994). The autonomic nervous system in sleep. Kryger MH, Roth T, Dement WC, eds. *Principles and Practice of Sleep Medicine*, 2nd ed. Philadelphia, Pa: WB Saunders 194-203.
- Parmeggiani, P. (2005). Physiologic regulation in sleep. Kriger MH, Roth T, Dement WC (Eds) *Principle and practice of sleep medicine*. WB Saunders, Philadelphia, 185-191.

- Parmeggiani, P., & Morrison, A. (1990). Autonomic activity during sleep. *AD Loewy, KM Spyer Eds., Central Regulation of Autonomic Functions, Oxford University Press, Oxford, UK*, 367-386.
- Parmeggiani, P. L. (1968). Telencephalo-diencephalic aspects of sleep mechanisms. *Brain Res*, 7(3), 350-359.
- Parmeggiani, P. L. (2003). Thermoregulation and sleep. *Front Biosci*, 8, s557-567.
- Parmeggiani, P. L., Cianci, T., Calasso, M., Zamboni, G., & Perez, E. (1980). Quantitative analysis of short term deprivation and recovery of desynchronized sleep in cats. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 50(3-4), 293-302.
- Parmeggiani, P. L., & Franzini, C. (1971). Changes in the activity of hypothalamic units during sleep at different environmental temperatures. *Brain Res*, 29(2), 347-350.
- Parmeggiani, P. L., & Rabini, C. (1967). Phases of sleep and environmental temperature. *Helv Physiol Pharmacol Acta*, 25(2), CR214-216.
- Parmeggiani, P. L., & Rabini, C. (1970). Sleep and environmental temperature. *Arch Ital Biol*, 108(2), 369-387.
- Parton, L., Ye, C., Coppari, R., Enriori, P., Choi, B., Zhang, C., Xu, C., Vianna, C., Balthasar, N., Lee, C., Elmquist, J., Cowley, M., & Lowell, B. (2007). Glucose sensing by POMC neurons regulates glucose homeostasis and is impaired in obesity. *Nature*, 449, 228-232.
- Peyron, C., Faraco, J., Rogers, W., Ripley, B., Overeem, S., Charnay, Y., Nevsimalova, S., Aldrich, M., Reynolds, D., Albin, R., Li, R., Hungs, M., Pedrazzoli, M., Padigaru, M., Kucherlapati, M., Fan, J., Maki, R., Lammers, G. J., Bouras, C., Kucherlapati, R., Nishino, S., & Mignot, E. (2000). A mutation in a case of early onset narcolepsy and a generalized absence of hypocretin peptides in human narcoleptic brains. *Nat Med*, 6(9), 991-997.

- Peyron, C., Tighe, D. K., van den Pol, A. N., de Lecea, L., Heller, H. C., Sutcliffe, J. G., & Kilduff, T. S. (1998). Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems. *J Neurosci*, 18(23), 9996-10015.
- Picciotto, M., Brabant, C., Einstein, E., Kamens, H., & Neugebauer, N. (2010). Effects of galanin on monoaminergic systems and HPA axis: potential mechanisms underlying the effects of galanin on addiction- and stress-related behaviors. *Brain Res*, 1314, 206-218.
- Pissios, P., Ozcan, U., Kokkotou, E., Okada, T., Liew, C., Liu, S., Peters, J., Dahlgren, G., Karamchandani, J., Kudva, Y., Kurpad, A., Kennedy, R., Maratos-Flier, E., & Kulkarni, R. (2007). Melanin concentrating hormone is a novel regulator of islet function and growth. *Diabetes*, 56(2), 311-319.
- Rechtschaffen, A. (1998). Current perspectives on the function of sleep. *Perspect Biol Med*, 41(3), 359-390.
- Rechtschaffen, A., Bergmann, B. M., Everson, C. A., Kushida, C. A., & Gilliland, M. A. (1989). Sleep deprivation in the rat: X. Integration and discussion of the findings. *Sleep*, 12(1), 68-87.
- Rechtschaffen, A., Gilliland, M. A., Bergmann, B. M., & Winter, J. B. (1983). Physiological correlates of prolonged sleep deprivation in rats. *Science*, 221(4606), 182-184.
- Rechtschaffen, A., & Kales, A. (1968). A Manual of standardized terminology, techniques and scoring system for sleep stages of human subjects. *Public Health Service, U.S. Government Printing Office*.
- Ricardo, J., & Koh, E. (1978). Anatomical evidence of direct projections from the nucleus of the solitary tract to the hypothalamus, amygdala, and other forebrain structures in the rat. *Brain Res*, 153(1), 1-26.

- Robinson, J., & Brewer, A. (2008). Galanin: a potential role in mesolimbic dopaminemediated instrumental behavior. *Neurosci. Biobehav. Rev*, 32(8), 1485-1493.
- Roseberry, A., Liu, H., Jackson, A., Cai, X., & Friedman, J. (2004). Neuropeptide Y-mediated inhibition of proopiomelanocortin neurons in the arcuate nucleus shows enhanced desensitization in ob/ob mice. *Neuron*, 41(5), 711-722.
- Rosin, D. L., Weston, M. C., Sevigny, C. P., Stornetta, R. L., & Guyenet, P. G. (2003). Hypothalamic orexin (hypocretin) neurons express vesicular glutamate transporters VGLUT1 or VGLUT2. *J Comp Neurol*, 465(4), 593-603.
- Sagot, Y., Swerts, J. P., & Cochard, P. (1991). Changes in permissivity for neuronal attachment and neurite outgrowth of spinal cord grey and white matters during development: a study with the 'cryoculture' bioassay. *Brain Res*, 543(1), 25-35.
- Sahu, A. (1998). Evidence suggesting that galanin (GAL), melanin-concentrating hormone (MCH), neurotensin (NT), proopiomelanocortin (POMC) and neuropeptide Y (NPY) are targets of leptin signaling in the hypothalamus. *Endocrinology*, 139(2), 795-798.
- Sahu, A., & Kalra, S. (1998). Absence of increased neuropeptide Y neuronal activity before and during the luteinizing hormone (LH) surge may underlie the attenuated preovulatory LH surge in middle-aged rats. *Endocrinology*, 139, 696-702.
- Sakurai, T. (2007). The neural circuit of orexin (hypocretin): maintaining sleep and wakefulness. *Nat Rev Neurosci*, 8(3), 171-181.
- Sakurai, T., Nagata, R., Yamanaka, A., Kawamura, H., Tsujino, N., & Muraki, Y. (2005). Input of orexin/hypocretin neurons revealed by a genetically encoded tracer in mice. *Neuron*, 46(2), 2297-2307.

- Samson, W. K., Bagley, S. L., Ferguson, A. V., & White, M. M. (2007). Hypocretin/orexin type 1 receptor in brain: role in cardiovascular control and the neuroendocrine response to immobilization stress. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 292(1), R382-387.
- Samuels, B. C., Zaretsky, D. V., & DiMicco, J. A. (2004). Dorsomedial hypothalamic sites where disinhibition evokes tachycardia correlate with location of raphe-projecting neurons. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 287(2), R472-478.
- Sano, H., & Yokoi, M. (2007). Striatal medium spiny neurons terminate in a distinct region in the lateral hypothalamic area and do not directly innervate orexin/hypocretin- or melanin-concentrating hormone-containing neurons. *J Neurosci.*, 27(26), 6948-6955.
- Saper, C., Swanson, L., & Cowan, W. (1979). An autoradiographic study of the efferent.
- Saper, C. B., Chou, T. C., & Scammell, T. E. (2001). The sleep switch: hypothalamic control of sleep and wakefulness. *Trends Neurosci*, 24(12), 726-731.
- Saper, C. B., Scammell, T. E., & Lu, J. (2005). Hypothalamic regulation of sleep and circadian rhythms. *Nature*, 437(7063), 1257-1263.
- Schwartz, M., Woods, S., Porte, D. J., Seeley, R., & Baskin, D. (2000). Central nervous system control of food intake. *Nature*, 404, 661-671.
- Schwartz, M. W., Woods, S. C., Porte, D., Jr., Seeley, R. J., & Baskin, D. G. (2000). Central nervous system control of food intake. *Nature*, 404(6778), 661-671.
- Scott, M., Lachey, J., Sternson, S., Lee, C., Elias, C., Friedman, J., & Elmquist, J. (2009). Leptin targets in the mouse brain. *J Compl Neurol*, 514, 518-532.

- Scott, M. M., Lachey, J. L., Sternson, S. M., Lee, C. E., Elias, C. F., Friedman, J. M., & Elmquist, J. K. (2009). Leptin targets in the mouse brain. *J Comp Neurol*, 514(5), 518-532.
- Segal-Lieberman, G., Bradley, R., Kokkotou, E., Carlson, M., Trombly, D., Wang, X., Bates, S., Myers, M. J., Flier, J., & Maratos-Flier, E. (2003). Melanin-concentrating hormone is a critical mediator of the leptin-deficient phenotype. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 100, 10085-10090.
- Sei, H. (1989). Long-term profiles of related hemodynamic changes in the postoperative chronic cat. *Physiol Behav.*, 46, 499-500.
- Sei, H., Sakai, K., Kanamori, N., Salvetti, D., Vanni-Mercier, G., & Jouvet, M. (1994). Long-term variations of arterial blood pressure during sleep in freely moving cats. *Physiol Behav*, 55(4), 673-679.
- Shapiro, C. M., Moore, A. T., Mitchell, D., & Yodaiken, M. L. (1974). How well does man thermoregulate during sleep? *Experientia*, 30(11), 1279-1281.
- Shearman, L., Camacho, R., Sloan Stribling, D., Zhou, D., Bednarek, M., & Hreniuk, D. (2003). Chronic MCH-1 receptor modulation alters appetite, body weight and adiposity in rats. *Eur J Pharmacol*, 475, 37-47.
- Sherin, J. E., Shiromani, P. J., McCarley, R. W., & Saper, C. B. (1996). Activation of ventrolateral preoptic neurons during sleep. *Science*, 271(5246), 216-219.
- Shimada, M., Tritos, N. A., Lowell, B. B., Flier, J. S., & Maratos-Flier, E. (1998). Mice lacking melanin-concentrating hormone are hypophagic and lean. *Nature*, 396(6712), 670-674.
- Shirasaka, T., Kunitake, T., Takasaki, M., & Kannan, H. (2002). Neuronal effects of orexins: relevant to sympathetic and cardiovascular functions. *Regul Pept*, 104, 91-95.

- Shirasaka, T., Takasaki, M., & Kannan, H. (2003). Cardiovascular effects of leptin and orexins. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.*, 284(3), R639-651.
- Sichieri, R., & Schmidek, W. R. (1984). Influence of ambient temperature on the sleep-wakefulness cycle in the golden hamster. *Physiol Behav*, 33(6), 871-877.
- Siegel, J. M. (2005). Clues to the functions of mammalian sleep. *Nature*, 437(7063), 1264-1271.
- Simerly, R. (1995). Anatomical substrates of hypothalamic integration. *Paxinos G, editor. The rat nervous system. Second Edition. San Diego: Academic Press*, 353-376.
- Sindrup, J., J, K., & Madsen, P. (1992). Nocturnal variations in human lower leg subcutaneous blood flow related to sleep stages. *J Appl Physiol.*, 73, 1246-1252.
- Smith, J. E., Jansen, A. S., Gilbey, M. P., & Loewy, A. D. (1998). CNS cell groups projecting to sympathetic outflow of tail artery: neural circuits involved in heat loss in the rat. *Brain Res*, 786(1-2), 153-164.
- Snyder, F., Hobson, J., & Morrison, D. (1964). Changes in respiration, heart rate, "nd systolic blood pressure in humam sleep. *J Appl Physiol.*, 19, 417-422.
- Standish, A., Enquist, L. W., Escardo, J. A., & Schwaber, J. S. (1995). Central neuronal circuit innervating the rat heart defined by transneuronal transport of pseudorabies virus. *J Neurosci*, 15(3 Pt 1), 1998-2012.
- Stanley, B., Magdalin, W., Seirafi, A., Thomas, W., & Leibowitz, S. (1993). The perifornical area: the major focus of (a) patchily distributed hypothalamic neuropeptide Ysensitive feeding system(s). *Brain Res.*, 604(01/02/13), 304-317.
- Sterman, M. B., & Clemente, C. D. (1962). Forebrain inhibitory mechanisms: cortical synchronization induced by basal forebrain stimulation. *Exp Neurol*, 6, 91-102.

- Sterman, M. B., & Clemente, C. D. (1962). Forebrain inhibitory mechanisms: sleep patterns induced by basal forebrain stimulation in the behaving cat. *Exp Neurol*, 6, 103-117.
- Stitt, J. T. (1973). Prostaglandin E1 fever induced in rabbits. *J Physiol*, 232(1), 163-179.
- Stornetta, R. L., Rosin, D. L., Simmons, J. R., McQuiston, T. J., Vujovic, N., Weston, M. C., & Guyenet, P. G. (2005). Coexpression of vesicular glutamate transporter-3 and gamma-aminobutyric acidergic markers in rat rostral medullary raphe and intermediolateral cell column. *J Comp Neurol*, 492(4), 477-494.
- Stratford, T., & Kelley, A. (1999). Evidence of a functional relationship between the nucleus accumbens shell and lateral hypothalamus subserving the control of feeding behavior. *J Neurosci.*, 19(24), 11040-11048.
- Stratford, T., Kelley, A., & Simansky, K. (1999). Blockade of GABAA receptors in the medial ventral pallidum elicits feeding in satiated rats. *Brain Res*, 825(01/02/13), 199-203.
- Sutcliffe, J., & de Lecea, L. (2002). The hypocretins: setting the arousal threshold. *Nat Rev Neurosci.*, 3(5), 339-349.
- Swanson, J., Schuck, S., Mann, M., Carlson, C., Hartman, K., & Sergeant, J. (2005). Categorical and dimensional definitions and evaluations of symptoms of ADHD: The SNAP and the SWAN Ratings Scales [Draft]. Available at: http://www.adhd.net/SNAP_SWAN.pdf Accessed May 25, 2005.
- Swanson, L., Sanchez-Watts, G., & Watts, A. (2005). Comparison of melanin-concentrating hormone and hypocretin/orexin mRNA expression patterns in a new parceling scheme of the lateral hypothalamic zone. *Neurosci. Lett.*, 387(2), 80-84.

- Szymusiak, R., & McGinty, D. (2008). Hypothalamic regulation of sleep and arousal. *Ann N Y Acad Sci*, 1129, 275-286.
- Takahashi, K., Lin, J. S., & Sakai, K. (2008). Neuronal activity of orexin and non-orexin waking-active neurons during wake-sleep states in the mouse. *Neuroscience*, 153(3), 860-870.
- Takahashi, Y., Zhang, W., Sameshima, K., Kuroki, C., Matsumoto, A., Sunanaga, J., Kono, Y., Sakurai, T., Kanmura, Y., & Kuwaki, T. Orexin neurons are indispensable for prostaglandin E2-induced fever and defence against environmental cooling in mice. *J Physiol*, 591(Pt 22), 5623-5643.
- Tanaka, M., & McAllen, R. M. (2005). A subsidiary fever center in the medullary raphe? *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 289(6), R1592-1598.
- Tanaka, M., Nagashima, K., McAllen, R. M., & Kanosue, K. (2002). Role of the medullary raphe in thermoregulatory vasomotor control in rats. *J Physiol*, 540(Pt 2), 657-664.
- Tanaka, M., Owens, N. C., Nagashima, K., Kanosue, K., & McAllen, R. M. (2006). Reflex activation of rat fusimotor neurons by body surface cooling, and its dependence on the medullary raphe. *J Physiol*, 572(Pt 2), 569-583.
- Tartaglia, L. (1997). The leptin receptor. *J Biol Chem*, 272(10), 6093-6096.
- Tartaglia, L. A. (1997). The leptin receptor. *J Biol Chem*, 272(10), 6093-6096.
- Tatemoto, K., Carlquist, M., & Mutt, V. (1982). Neuropeptide Y--a novel brain peptide with structural similarities to peptide YY and pancreatic polypeptide. *Nature*, 296(5858), 659-660.
- Ter Horst, G., Hautvast, R., De Jongste, M., & J, K. (1996). Neuroanatomy of cardiac activity-regulating circuitry: a transneuronal retrograde viral labelling study in the rat. *The European journal of neuroscience*, 8, 2029-2041.

- Thannickal, T., Moore, R., Nien-huis, R., Ramanathan, L., Gulyani, S., & Aldrich, M. (2000). Reduced number of hypocretin neurons in human narcolepsy. *Neuron*, 27, 469-474.
- Thannickal, T. C., Moore, R. Y., Nienhuis, R., Ramanathan, L., Gulyani, S., Aldrich, M., Cornford, M., & Siegel, J. M. (2000). Reduced number of hypocretin neurons in human narcolepsy. *Neuron*, 27(3), 469-474.
- Thompson, R. H., & Swanson, L. W. (2003). Structural characterization of a hypothalamic visceromotor pattern generator network. *Brain Res Brain Res Rev*, 41(2-3), 153-202.
- Tobler, I., & AA, B. (1986). Sleep EEG in the rat as a function of prior waking. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 64(1), 74-76.
- Tobler, I., & Scherschlicht, R. (1990). Sleep and EEG slow-wave activity in the domestic cat: effect of sleep deprivation. *Behav Brain Res*, 37(2), 109-118.
- Tononi, G., & Cirelli, C. (2005). Sonno. *Fisiologia Medica a cura di Friorenzo Conti*, 329-352.
- Tononi, G., & Cirelli, C. (2006). Sleep function and synaptic homeostasis. *Sleep Med Rev*, 10(1), 49-62.
- Torrealba, F., Yanagisawa, M., & Saper, C. (2003). Colocalization of orexin a and glutamate immunoreactivity in axon terminals in the tuberomammillary nucleus in rats. *Neuroscience*, 119, 1033-1044.
- Tortorella, S., Rodrigo-Angulo, M., Núñez, A., & Garzón, M. (2013). Synaptic interactions between perifornical lateral hypothalamic area, locus coeruleus nucleus and the oral pontine reticular nucleus are implicated in the stage succession during sleep-wakefulness cycle. *Front Neurosci.*, Nov 19.

- Trachsel, L., Tobler, I., & Borbèly, A. (1988). Electroencephalogram analysis of non-rapid eye movement sleep in rats. *Am J Physiol.*, 255(1 pt 2), R27-37.
- Tritos, N., Vicent, D., Gillette, J., Ludwig, D., Flier, E., & E, M.-F. (1998). Functional interactions between melanin-concentrating hormone, neuropeptide Y, and anorectic neuropeptides in the rat hypothalamus. *Diabetes*, 47, 1687-1692.
- Tsai, L. L., Bergmann, B. M., & Rechtschaffen, A. (1992). Sleep deprivation in the rat: XVI. Effects in a light-dark cycle. *Sleep*, 15(6), 537-544.
- Tsujino, N., Yamanaka, A., Ichiki, K., Muraki, Y., Kilduff, T., & Yagami, K. (2005). Cholecystokinin activates orexin/hypocretin neurons through the cholecystokinin A receptor. *J Neurosci.*, 25, 7459-7469.
- Tsunematsu, T., Kilduff, T., Boyden, E., Takahashi, S., Tominaga, M., & Yamanaka, A. (2011). Acute optogenetic silencing of orexin/hypocretin neurons induces slow-wave sleep in mice. *J Neurosci.*, 31, 10529-10539.
- Tsunematsu, T., Kilduff, T. S., Boyden, E. S., Takahashi, S., Tominaga, M., & Yamanaka, A. Acute optogenetic silencing of orexin/hypocretin neurons induces slow-wave sleep in mice. *J Neurosci*, 31(29), 10529-10539.
- Tsunematsu, T., Tabuchi, S., Tanaka, K., Boyden, E., Tominaga, M., & Yamanaka, A. (2013). Long-lasting silencing of orexin/hypocretin neurons using archaerhodopsin induces slow-wave sleep in mice. *Behav Brain Res*, 255, 64-74.
- Tsunematsu, T., Tabuchi, S., Tanaka, K. F., Boyden, E. S., Tominaga, M., & Yamanaka, A. Long-lasting silencing of orexin/hypocretin neurons using archaerhodopsin induces slow-wave sleep in mice. *Behav Brain Res*, 255, 64-74.
- Tupone, D., Madden, C., Cano, G., & SF, M. (2012). An orexinergic projection from perifornical hypothalamus to raphe pallidus increases rat brown adipose tissue thermogenesis. *Neurosci.*, 31, 15944-15955.

- van den Pol AN, Yao Y, Fu LY, Foo K, Huang H, Coppari R, Lowell BB & Broberger C. (2009). Neuromedin B and gastrin-releasing peptide excite arcuate nucleus neuropeptide Y neurons in a novel transgenic mouse expressing strong Renilla green fluorescent protein in NPY neurons. *J Neurosci* 29, 4622-4639.
- Vivaldi, E., Ocampo, A., Wyneken, V., Roncaglielo, M., & Zapata, A. (1994). Short-term homeostasis of active sleep and the architecture of sleep in the rat. *J Neurophysiol.*, 72(4), 1745-1755.
- Wallenstein, S., Zucker, C., & Fleiss, J. (1980). Some statistical methods useful in circulation research. *Circ Res.*, 47(1), 1-9.
- Werth, E., Dijk, D., Achermann, P., & Borbély, A. (1996). Dynamics of the sleep EEG after an early evening nap: experimental data and simulations. *Am J Physiol.*, 271(3 pt 2), R501-510.
- White, D., Kuropatwinski, K., Devos, R., Baumann, H., & Tartaglia, L. (1997). Leptin receptor (OB-R) signaling. Cytoplasmic domain mutational analysis and evidence for receptor homo-oligomerization. *J Biol Chem.*, 272(7), 4065-4071.
- Williams, J. W., Rudy, T. A., Yaksh, T. L., & Viswanathan, C. T. (1977). An extensive exploration of the rat brain for sites mediating prostaglandin-induced hyperthermia. *Brain Res*, 120(2), 251-262.
- Williams, R., Jensen, L., Verkhatsky, A., Fugger, L., & Burdakov, D. (2007). Control of hypothalamic orexin neurons by acid and CO₂. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 104, 10685-10690.
- Willie, J., Chemelli, R., Sinton, C., Tokita, S., Williams, S., & Kisanuki, Y. (2003). Distinct narcolepsy syndromes in Orexin receptor-2 and Orexin null mice: molecular genetic dissection of NREM and REM sleep regulatory processes. *Neuron*, 38, 715-730.

- Willie, J. T., Chemelli, R. M., Sinton, C. M., & Yanagisawa, M. (2001). To eat or to sleep? Orexin in the regulation of feeding and wakefulness. *Annu Rev Neurosci*, 24, 429-458.
- Winer, B., Brown, D., & Michels, K. (1991). Statistical principles in experimental designs. 3.ed. *New York: McGraw-Hill*, 1057.
- Winsky-Sommerer, R., Yamanaka, A., Diano, S., Borok, E., Roberts, A., & Sakurai, T. (2004). Interaction between the cortico tropin-releasing factor system and hypocretins (orexins): a novel circuit mediating stress response. *J Neurosci*, 24, 11439-11448.
- Wollmann, G., Acuna-Goycolea, C., & Van den Pol, A. (2005). Direct excitation of hypocretin/orexin cells by extracellular ATP at P2X receptors. *J Neurophysiol*, 94, 2195-2206.
- Xi, M., Morales, F., & Chase, M. (2001). Effects on sleep and wakefulness of the injection of hypocretin-1 (orexin-A) into the laterodorsal tegmental nucleus of the cat. *Brain Res*, 901, 259-264.
- Yamamoto, Y., Ueta, Y., Serino, R., Nomura, M., Shibuya, I., & Yamashita, H. (2000). Effects of food restriction on the hypothalamic prepro-orexin gene expression in genetically obese mice. *Brain Res Bull*, 51(6), 515-521.
- Yamanaka, A., Beuckmann, C., Willie, J., Hara, J., Tsujino, N., & Mieda, M. (2003). Hypothalamic orexin neurons regulate arousal according to energy balance in mice. *Neuron*, 38, 701-713.
- Yamanaka, A., Muraki, Y., Ichiki, K., Tsujino, N., Kilduff, T., & Goto, K. (2006). Orexin neurons are directly and indirectly regulated by catecholamines in a complex manner. *J Neurophysiol*, 96, 284-298.

- Yamanaka, A., Muraki, Y., Tsujino, N., Goto, K., & Sakurai, T. (2003). Regulation of orexin neurons by the monoaminergic and cholinergic systems. *Biochem Biophys Res Commun*, 303(1), 120-129.
- Yamanaka, A., Sakurai, T., Katsumoto, T., Yanagisawa, M., & Goto, K. (1999). Chronic intracerebroventricular administration of orexin-A to rats increases food intake in daytime, but has no effect on body weight. *Brain Res*, 849(1-2), 248-252.
- Yamanaka, A., Tabuchi, S., Tsunematsu, T., Fukazawa, Y., & Tominaga, M. (2010). Orexin directly excites orexin neurons through orexin 2 receptor. *J Neurosci.*, 30, 12642-12652.
- Yuan C, Lu W, Xiang T, Yi F, Liu G, Ren G & Song F. Generation of mammalian cell lines with gene knock-down for human MCHR2. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 56 Suppl, OL1359-1365.
- Zahm, D. (2000). An integrative neuroanatomical perspective on some subcortical substrates of adaptive responding with emphasis on the nucleus accumbens. *Neurosci. Biobehav. Rev*, 24(1), 85-105.
- Zahm, D., Williams, E., & Wohltmann, C. (1996). Ventral striatopallidothalamic projection: IV. Relative involvements of neurochemically distinct subterritories in the ventral pallidum and adjacent parts of the rostroventral forebrain. *J Compl Neurol*, 364(2), 340-362.
- Zamboni, G., Amici, R., Perez, E., Jones, C. A., & Parmeggiani, P. L. (2001). Pattern of REM sleep occurrence in continuous darkness following the exposure to low ambient temperature in the rat. *Behav Brain Res*, 122(1), 25-32.

- Zamboni, G., Perez, E., Amici, R., Jones, C. A., & Parmeggiani, P. L. (1999). Control of REM sleep: an aspect of the regulation of physiological homeostasis. *Arch Ital Biol*, 137(4), 249-262.
- Zaretskaia, M. V., Zaretsky, D. V., Sarkar, S., Shekhar, A., & DiMicco, J. A. (2008). Induction of Fos-immunoreactivity in the rat brain following disinhibition of the dorsomedial hypothalamus. *Brain Res*, 1200, 39-50.
- Zepelin, H., & Rechtschaffen, A. (1974). Mammalian sleep, longevity, and energy metabolism. *Brain Behav Evol*, 10(6), 425-470.
- Zeppelin, H., Siegel, G., & Tobler, I. (2005). Mammalian sleep. In Principles and practice of sleep medicine. *Philadelphia, Saunders*, 91-100.
- Zhang, W., Sakurai, T., Fukuda, Y., & Kuwaki, T. (2006). Orexin neuron-mediated skeletal muscle vasodilation and shift of baroreflex during defense response in mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 290(6), R1654-1663.
- Zhang, W., Sunanaga, J., Takahashi, Y., Mori, T., Sakurai, T., Kanmura, Y., & Kuwaki, T. Orexin neurons are indispensable for stress-induced thermogenesis in mice. *J Physiol*, 588(Pt 21), 4117-4129.
- Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., & Friedman, J. (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, 372(6505), 425-432.